

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka

Diplomová práce

**Laboratorní diagnostika a HLA typizace nemocných s revmatoidní
artritidou**



Bc. Marek Škoda

Praha, 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana Půtová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně za použití uvedených literárních pramenů. Souhlasím se zapůjčením mé práce ke studijním účelům.

V Praze, 9. 8. 2010

Bc. Marek Škoda

Děkuji:

RNDr. Ivaně Půtové, vedoucí imunologické laboratoře Revmatologického ústavu v Praze, za zadání, trpělivý přístup a odborné vedení mé práce,

RNDr. Peteru Novotovi PhD., vedoucímu laboratoře molekulární biologie Revmatologického ústavu v Praze, za cenné rady, pomoc při zpracování datového materiálu a poskytnutí údajů kontrolního souboru pacientů.

Markétě Kubálkové a Tereze Horákové, laborantkám Revmatologického ústavu v Praze a rovněž genetičce Mgr. Ivě Sakmaryové z firmy VIDIA diagnostika s.r.o., za teoretické i praktické uvedení do problematiky práce v laboratoři.

Bc. Pavlu Čechovi za pomoc s grafickou úpravou textu.

ABSTRAKT

Laboratorní diagnostika a HLA typizace nemocných s revmatoidní artritidou.

Předkládaná práce studuje vztah mezi nosičstvím alel DRB1 genu a přítomností klinicky nejvýznamnějších autoprotilátek u nemocných s revmatoidní artritidou (RA). Soubor 81 pacientů s RA byl laboratorně vyšetřen a genotypizován. Stanovena byla prevalence nejčastěji prokazovaných analytů: antinukleárních protilátek (ANA), revmatoidních faktorů (RF), anti-CCP protilátek a anti-MCV protilátek. HLA-DRB1 alely byly detekovány metodou SSP-PCR s nízkým rozlišením (low resolution). Cíl studie spočíval v zjištění frekvencí DRB1 alel u české populace nemocných a vyšetření vztahu mezi nosičstvím těchto alel a produkcí jednotlivých autoprotilátek. U českých pacientů s RA byla nalezena asociace s HLA-DRB1*01 a HLA-DRB1*04 alelami. V porovnání s kontrolní populací byla u nemocných s RA významně snížena frekvence alely DRB1*15. Studium vztahu mezi nosičstvím DRB1 alel a přítomností klinicky nejvýznamnějších protilátek ukázalo významně zvýšené frekvence DRB1*04 alely u pacientů s pozitivitou ACPA protilátek (anti-CCP, anti-MCV). U ostatních protilátek (ANA, RF) nebyl vztah mezi jejich produkcí a nosičstvím DRB1 alel nalezen. Porovnání výše hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek mezi skupinami RA pacientů s přítomností a absencí DRB1*04 alely neukázalo signifikantní rozdíl. Dále nebyl prokázán významný rozdíl ve výši hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu.

Klíčová slova: revmatoidní artritida, HLA typizace, HLA-DR, sdílený epitop, revmatoidní faktor, anti-CCP, anti-MCV, ANA

ABSTRACT**Laboratory Diagnostics and HLA Typization of Patients with Rheumatoid Arthritis**

This work studies the relationship between DRB1 alleles and production of clinically most important autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis (RA). A group of 81 patients with RA were diagnosed in immunological laboratory and genotyped. The prevalence of most often tested analytes were determined: antinuclear antibodies (ANA), rheumatoid factor (RF), anti-CCP antibodies and anti-MCV antibodies. HLA-DRB1 alleles were detected using PCR-SSP low resolution. The aim of this study was to determine the frequency of DRB1 alleles in Czech patients and to investigate the relationship between DRB1 alleles and production of particular antibodies. The frequency of HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*04 alleles was significantly increased in RA patients compared to healthy subjects. In contrast, the frequency of DRB1*15 allele was significantly reduced. Studying the relationship between DRB1 alleles and presence of antibodies showed a significantly increased frequency of DRB1*04 allele in patients with positive ACPA antibodies (anti-CCP, anti-MCV). Regarding other antibodies (ANA, RF), no relationship between their production and presence of DRB1 alleles was found. Comparison of anti-CCP and anti-MCV antibodies levels between groups of RA patients with the presence and absence of DRB1*04 alleles showed no difference. Furthermore, no difference of anti-CCP and anti-MCV levels, when comparing DRB1*04 homozygotes and heterozygotes, was found.

Keywords: rheumatoid arthritis, HLA typization, HLA-DR, shared epitope, rheumatoid factor, anti-CCP, anti-MCV, ANA

OBSAH

1.	ÚVOD	1
1.1	Hypotézy	4
1.2	Cíle práce	4
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
2.1	Autoimunita	5
	Genetické aspekty autoimunity	6
	Hormonální vlivy	7
	Faktory zevního prostředí	7
2.2	HLA systém	9
2.2.1	Definice	9
2.2.2	Genová oblast	9
2.2.3	HLA nomenklatura	11
2.2.4	Dědičnost HLA	11
2.2.5	Funkce HLA systému	12
2.2.6	Polymorfismus MHC glykoproteinů	12
2.2.7	Laboratorní metody určování HLA	12
2.2.8	HLA a autoimunitní onemocnění	13
2.3	Revmatoidní artritida	14
2.3.1	Charakteristika onemocnění	14
2.3.2	Epidemiologie	14
2.3.3	Genetika RA	14
2.3.4	Etiopatogeneze	23
2.3.5	Klinický obraz	27
2.3.6	Psychosomatické aspekty	29
2.3.7	Terapie RA	30
2.4	Laboratorní diagnostika	31
2.4.1	Obecná charakteristika autoprotilátek	31
2.4.2	Diferenciální laboratorní diagnostika RA	32
2.4.2.1	Autoprotilátky u RA	35
3.	SOUBORY PACIENTŮ	45
4.	METODY	47
4.1	Laboratorní stanovení autoprotilátek	47
4.1.1	Detekce revmatoidních faktorů IgG, IgA, IgM metodou ELISA	47
4.1.1.1	Princip metody (RF IgG)	47
4.1.1.2	Složení soupravy:	48
4.1.1.3	Vybavení potřebné k provedení testu:	48
4.1.1.4	Příprava reagensů a vzorku k vyšetření:	48
4.1.1.5	Interpretace výsledků:	49
4.1.1.6	Princip metody RF IgA, RF IgM	49
4.1.2	Stanovení revmatoidního faktoru latex fixačním testem	50
4.1.2.1	Princip metody LFT	50
4.1.2.2	Složení soupravy:	50
4.1.2.3	Vybavení potřebné k provedení testu:	50

4.1.2.4	Příprava reagensií a vzorků k vyšetření:	50
4.1.2.5	Pracovní postup:	51
4.1.2.6	Interpretace výsledků	51
4.1.3	Detekce anti-CCP IgG metodou ELISA	52
4.1.3.1	Princip metody anti-CCP IgG	52
4.1.3.2	Složení soupravy:	52
4.1.3.3	Vybavení potřebné k provedení testu:	53
4.1.3.4	Příprava reagensií:	53
4.1.3.5	Pracovní postup:	53
4.1.3.6	Interpretace výsledků	54
4.1.4	Stanovení anti-MCV protilátek metodou ELISA	54
4.1.4.1	Princip metody	55
4.1.4.2	Složení soupravy:	55
4.1.4.3	Vybavení potřebné k provedení testu:	56
4.1.4.4	Příprava reagensií:	56
4.1.4.5	Pracovní postup	56
4.1.4.6	Interpretace výsledků	57
4.1.5	Stanovení ANA protilátek metodou nepřímé imunofluorescence (IIF)	57
4.1.5.1	Princip metody	57
4.1.5.2	Složení soupravy:	58
4.1.5.3	Vybavení potřebné k provedení testu:	59
4.1.5.4	Příprava reagensií:	59
4.1.5.5	Pracovní postup:	59
4.1.5.6	Interpretace výsledků	59
4.2	Detekce alel HLA II. třídy metodou SSP	60
4.2.1	Princip metody	60
4.2.2	Složení soupravy	60
4.2.3	DNA izolace	61
4.2.3.1	Postup izolace DNA	61
4.2.4	PCR amplifikace	62
4.2.4.1	Postup PCR	62
4.2.4.2	Detekce PCR produktů	63
5.	VÝSLEDKY	64
5.1	Statistická analýza	64
5.2	Výsledky detekce autoprotilátek	64
5.2.1	Vyšetřované autoprotilátky	64
5.2.1.1	ANA	64
5.2.1.2	RF LFT	64
5.2.1.3	RF ELISA IgG, IgA, IgM	65
5.2.1.4	Anti-CCP	65
5.2.1.5	Anti-MCV	65
5.2.2	Výskyt protilátek u souboru nemocných s RA	66
5.2.3	Rozdělení vyšetřovaného souboru na základě přítomnosti či absence autoprotilátek	66
5.3	Výsledky typizace HLA II. třídy u pacientů s RA	67
5.3.1	Distribuce HLA-DRB1 alel v souboru 81 pacientů s RA	67
5.3.2	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu mezi souborem pacientů s RA a souborem zdravých kontrol	68
5.3.3	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu v rámci souboru RA pacientů	70
5.3.3.1	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu ANA+ a ANA- pacientů	70
5.3.3.2	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF LFT+ a RF LFT- pacientů	71
5.3.3.3	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgG+ a RF IgG- pacientů	72
5.3.3.4	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgA+ a RF IgA- pacientů	72
5.3.3.5	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgM+ a RF IgM- pacientů	73
5.3.3.6	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u anti-CCP+ a anti-CCP- pacientů	74

5.3.3.7	Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u anti-MCV+ a anti-MCV- pacientů.....	75
5.3.4	Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek u vyšetřovaného souboru nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely.....	76
5.3.5	Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek u vyšetřovaného souboru nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely.....	76
5.3.6	Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek mezi homozygoty a hetero-zygoty pro DRB1*04 alelu.....	77
5.3.7	Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek mezi homozygoty a hetero-zygoty pro DRB1*04 alelu.....	78
6.	DISKUZE.....	79
7.	ZÁVĚR	85
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	87

Seznam zkratek

ACPA – protilátky proti citrulinovaným proteinům

ACR - American college of rheumatology

AK - aminokyselina

AKA – protilátky proti keratinu (anti-keratin antibodies)

ANA - antinukleární protilátky (anti-nuclear antibodies)

anti-A2-RA/33 – protilátky proti heterogennímu jadernému ribonukleoproteinu A2

anti-CCP - protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu

anti-MCV – protilátky proti mutovanému či modifikovanému citrulinovanému vimentinu

anti-Sa - protilátky proti citrulinovanému vimentinu

anti -SSA/Ro – protilátky proti antigenu SS-A/Ro

APC – buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)

APF – protilátky proti perinukleárnímu faktoru

B-buňka (lymfocyt) – buňka imunitního systému zodpovědná především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď

Bcl-2 - protoonkogen blokující apoptózu

BiP – imunoglobulin vázící protein (immunoglobulin binding protein)

bp - páry bazí (base pair)

BSA – albumin hovězího séra (bovine serum albumin)

C - cytosin

C (1-9) - komplement

CD - rozlišovací shluk (cluster of differentiation)

CMV - cytomegalovirus

ČRA – časná revmatoidní artritida

CRP - C-reaktivní protein

Csk - c-src tyrosin kináza

CTLA - cytotoxic T-lymphocyte antigen

DAS - skóre aktivity choroby (disease activity score)

DM - diabetes mellitus

DMARDs - chorobu modifikující léky (disease modifying anti-rheumatic drugs)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DNP - deoxyribonukleoprotein

EBNA - jaderný antigen viru Epstein-Barrové

EBV - virus Epstein-Barrové

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

EIA – enzymová imunoanalýza

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

Fas - povrchová buněčná molekula, jejíž aktivace vede k apoptóze buňky

FasL - Fas ligand

Fc – „krystalizující“ fragment imunoglobulinu

FITC - fluorescein isothiocyanate

FW - sedimentace erytrocytů dle A. Fahraeuse a A. Westergrena

GM-CSF - faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte – monocyte - colony- stimulating factor)

Gp - glykoprotein

GWAS – celogenomová asociační studie (genome-wide association study)

HEp-2 – buněčná linie karcinomu laryngu

HLA - lidský hlavní histokompatibilní komplex (human leukocyte antigen)

Hn RNP – heterogenní nukleární ribonukleoprotein

HRP – křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

H-řetězec – těžký řetězec (heavy)

Hsp - protein tepelného šoku (heat shock protein)

ICAM – mezibuněčná adhezivní molekula (inter-cellular adhesion molecule)

IF – intermediální filamenta

IFA – indirect immunofluorescence antibody

IIF – nepřímá imunofluorescence (indirect immunofluorescence)

Ig - imunoglobulin

IgA - imunoglobulin A

IgE - imunoglobulin E

IgM - imunoglobulin M

IgG – imunoglobulin G

IL - interleukin

I κ B - inhibitor NF κ B

IK - imunokomplex

INF- γ - interferon- γ

LFA-1 - adhezivní molekula (lymphocyte function antigen-1)

LFT – latex fixační test

kb - kilobáze

kDa – kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)

Lyp – lymfoidní linie buněk

Mb - megabáze

MCTD – smíšené onemocnění pojivové tkáně (mixed connection tissue disease)

m.h. – molekulová hmotnost

MHC - hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

MICA – neklasické MHC molekuly (MHC class I. chain-related gene A)

MMP - matrixová metaloproteináza (matrix metalloproteinase)

mRNA - informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)

miRNA – micro ribonukleová kyselina (micro ribonucleic acid)

N – dusík (nitrogenium)

NF κ B - jaderný transkripční faktor κ B (nuclear transcribing factor κ B)

NIMA – non inherited maternal HLA antigens

NK - přirození zabíječi (natural killer cells)

OR - poměr šancí (odds ratio)

PAD - peptidylarginindeimináza (peptidylarginin deiminase)

PBS - phosphate buffered saline

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PCR-SSO - polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy (polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotides)

PCR-SSP - polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (polymerase chain reaction with sequence specific primers)

PCR-SBT – přímé sekvenování (sequencing based typing)

PHF – plant homeodomain finger protein

POCT – point of care test

PTPN22 - gen pro tyrosin fosfatázu

RA - revmatoidní artritida

resp. - respektive

RF - revmatoidní faktor

RR – relativní riziko

RÚ – Revmatologický ústav

SE - sdílený epitop (shared epitope)

SNP - jednonukleotidová záměna (single-nucleotide polymorphism)

Src - protein tyrosin kináza (tyrosine kinase)

SS – Sjögrenův syndrom

SLE – systémový lupus erythematoses

STAT - přenašeč signálu a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)

T - thymin

Taq – thermus aquaticus

TBE – tris/borate/EDTA pufr

TCR - receptor T-lymfocytů (T-cell receptor)

TE – tris/EDTA

Th-lymfocyt – pomocný T lymfocyt

Tc-lymfocyt – cytotoxický T lymfocyt

tj. – to jest

TNF α - tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)

TNF β - tumor nekrotizující faktor β (tumor necrosis factor β (LT α))

TNFR - receptor pro tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor receptor)

TRAF - faktor asociovaný s TNFR (TNFR associating factor)

TMB – tetramethyl benzidin

tzn. – to znamená

UV - ultrafialový (ultraviolet)

VCAM-1 - vaskulární adhezivní molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1)

VLA-4 - very late antigen 4

vs. – versus

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

WTCC – Wellcome Trust Case Consortium

1. ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) je chronické systémové autoimunitní onemocnění postihující až 1 % populace. Léčba nemocných zasahuje do řady medicínských oborů a představuje významný problém současného lékařství. RA výrazně zkracuje život, vede k disabilitě a je častou příčinou částečné či plné invalidity nositelů. Snížením kvality života negativně ovlivňuje rodinný, sociální a psychický stav nemocných.

Základem patogeneze je narušení imunitní odpovědi charakterizované aktivací imunokompetentních buněk. Autoimunitně indukovaný zánět infiltruje synovii, burzy, šlachy, periartikulární měkké tkáně, destruuje chrupavku i kost za vzniku deformit postižených kloubů. Systémové projevy zahrnují tvorbu proteinů akutní fáze a produkci autoprotilátek. Klinicky manifestní je symetrická chronická polyartritida s variabilní přítomností mimokloubních příznaků (vaskulitida, plicní, srdeční, kožní onemocnění).

Protože je každé systémové autoimunitní onemocnění asociováno s charakteristickým spektrem autoprotilátek, opírá se revmatologická diagnostika o průkaz jejich přítomnosti. Imunologické vyšetření tak vedle anamnézy, klinických a paraklinických dat významně přispívá k včasnému stanovení diagnózy, indikaci adekvátní terapie, a tím i zlepšení prognózy, minimalizaci komplikací a stabilizaci stavu nemocných. Úkolem diferenciální laboratorní diagnostiky je odlišení RA od ostatních druhů artritid a některých chorob infekční etiologie.

Hlavní úlohu v imunologické laboratorní diagnostice RA hrají dva markery. Mezi nejznámější autoprotilátky vůbec patří revmatoidní faktor (RF). Přestože není pro onemocnění zcela specifický a vyskytuje se u široké škály dalších chorob, je jeho pozitivita jedním z hlavních diagnostických kritérií používaných u RA. Druhý a významnější indikátor onemocnění představují protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP).

Anti-CCP protilátky jsou pro RA vysoce specifické a u jiných onemocnění se vyskytují zřídka. Nalézány bývají i u řady tzv. séronegativních RA pacientů, tj. nemocných negativních pro RF. Přítomnost anti-CCP je prokazována již na počátku choroby,

potvrzena je asociace se závažností dalšího průběhu, především s progresí chrupavčitých a kostěných destrukcí detekovaných na RTG snímcích. Současný výskyt anti-CCP protilátek a IgM revmatoidních faktorů umocňuje diagnostickou i prediktivní hodnotu vyšetření.

Třetím významným testem je průkaz protilátek proti mutovanému cyklickému vimentinu (anti-MCV). Vyšetření anti-MCV protilátek bylo do rutinní diagnostiky RA zavedeno teprve nedávno a je pro onemocnění vysoce specifické a senzitivní. Anti-MCV protilátky jsou přítomny v časném stádiu onemocnění, což umožňuje detekci časně RA a indikaci adekvátní léčby těsně po vzplanutí nemoci. V literárních pramenech je popisován vzájemný vztah mezi zvýšenou hladinou anti-MCV protilátek a aktivitou a závažností onemocnění.

Přítomnost a zvýšenou hladinu výše zmíněných autoprottilátek lze považovat za významný patogenetický faktor, který spoluvytváří klinický obraz onemocnění.

Delší dobu je známa spojitost některých genů HLA systému s vnímavostí k nemoci. Zjištění, že některé, s RA asociované, DRB1 alely kódují společnou sekvenci pěti aminokyselin, vedlo k návrhu hypotézy tzv. sdíleného epitopu (SE). Sdílený epitop (SE) se u kavkazské a asijské populace považuje za s RA primárně asociovaný, alely jej kódující lze nalézt u většiny postižených, jejich přítomnost je spojena s vyšší vnímavostí ke vzniku RA a se závažnějším průběhem choroby. Vzhledem k vysoce pravděpodobné účasti zmíněných genových variant na patogenezi RA byly podniknuty četné pokusy o vyšetření závislosti mezi nosičstvím SE alel a produkcí autoprottilátek.

Ve své práci jsem se zaměřil na stanovení přítomnosti klinicky nejvýznamnějších autoprottilátek u pacientů s RA a rozlišení nemocných na základě positivity či negativity nálezů. Provedl jsem HLA typizaci a soustředil se na vyšetření závislosti mezi přítomností autoprottilátek a nosičstvím HLA-DRB1 alel.

Projekt diplomové práce navazuje na výsledky studií, které byly provedeny v Revmatologickém ústavu v Praze v rámci řešení grantových projektů či výzkumných záměrů:

NS-10065-4

Ambulance časně artritidy, MUDr. Heřman Mann, 1. 1. 2009 - 31. 12. 2011

MZO 00000023728

Etiopatogenetické mechanismy molekulárně genetické základny, sociálně zdravotní důsledky a terapie refrakterních forem zánětlivých revmatických onemocnění

Příjemce: Revmatologický ústav

Hl. řešitel Prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc.

2005 – 2011

MSM 0021620812

Chronická onemocnění vznikající na podkladě nepřiměřené reaktivity imunitního systému, jejich patogeneze a možnosti včasné diagnostiky a léčby

Příjemce: Univerzita Karlova Praha

Vykonavatel: 2. lékařská fakulta

Hlavní řešitel: prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.

Projekt C-d: Systémová autoimunitní onemocnění

Řešitel projektu C-d: prof. MUDr. Jiří Vencovský, DrSc.

2005 – 2011

1.1 Hypotézy

1. *Soubor pacientů s revmatoidní artritidou vykazuje odlišnou distribuci alel DRB1 genu v porovnání se souborem zdravých kontrol.*
2. *Pacienti s pozitivním nálezem anti-CCP a anti-MCV protilátek vykazují signifikantně vyšší frekvence DRB1*04 alely v porovnání s pacienty anti-CCP a anti-MCV negativními.*
3. *Pacienti s pozitivním nálezem RF, stanoveným jak LFT, tak metodou ELISA nevykazují signifikantně vyšší frekvence DRB1*04 alely v porovnání s pacienty RF negativními.*
4. *Nositelé DRB1*04 alely vykazují vyšší hladiny anti-CCP a anti-MCV protilátek v porovnání s pacienty s absencí této alely.*
5. *Homozygotní genotyp pro DRB1*04 alelu je asociován s vyšší produkcí anti-CCP a anti-MCV protilátek v porovnání s heterozygotním genotypem.*

1.2 Cíle práce

1. U souboru nemocných s revmatoidní artritidou stanovit prevalence autoprotilátek (anti-CCP, anti-MCV, RF, ANA) a definovat skupiny nemocných dle přítomnosti sledovaných autoprotilátek.
2. U souboru pacientů s RA provést HLA typizaci a potvrdit porovnáním se skupinou zdravých kontrol předpokládané asociace HLA-DRB1 alel s chorobou.
3. Zjistit, zda existuje závislost mezi nosičstvím určitých HLA-DRB1 alel a přítomností autoprotilátek.
4. Porovnat výši hladin anti-CCP a anti-MCV autoprotilátek u pacientů, kteří nesou a kteří nenesou DRB1*04 alelu a rovněž mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu.

Předpokládali jsme, že přítomnost a výše hladin vyšetřovaných autoprotilátek je významným patogenetickým faktorem, který se podílí na vzniku a progresi revmatoidní artritidy. V souvislosti s etiopatogenezí nemoci se nabízí otázka, zda existuje asociace určitých HLA-DRB1 alel s přítomností určité autoprotilátky.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Autoimunita

Imunitní systém zaručuje autonomii jedince, udržuje homeostázu a integritu organismu, za fyziologických okolností rozeznává škodlivé od neškodného, vlastní od cizího. Jeho funkcí je ochrana proti zevním i vnitřním patogenům. Celkově se uplatňuje při zajišťování následujících procesů:

Obranyschopnosti - ochraně organismu před invazí vnějších škodlivin.

Autotoleranci - rozpoznání tkání vlastního organismu a udržování tolerance vůči nim.

Imunitním dohledu - rozpoznání vnitřních patogenů a jejich likvidaci, tzn. průběžném odstraňování starých, poškozených a mutovaných buněk.

Autoimunitu lze definovat jako schopnost imunitního systému reagovat s vlastními tkáněmi, nebo též jako imunitní reakci proti vlastním složkám – autoantigenům. Autoimunitní reakce se dělí na:

Fyziologické, které jsou nedílnou součástí imunitního systému obratlovců a mají obvykle zabránit vzniku onemocnění. Tak může nízká úroveň autoimunity napomoci při detekci neoplastických CD 8 + buněk T-lymfocyty, či navodit rychlou imunitní reakci v počátečních stádiích infekce.

Patologické, kdy dochází k selhání imunitního systému, prolomení autotolerance, přehnané imunitní reakci charakterizované nerozpoznáním vlastních buněk a tkání a jejich poškozováním. Jakákoli choroba vyplývající z popsané abnormální reakce se nazývá autoimunitní. Rovnováha mezi fyziologickou a patologickou reaktivitou je křehká.

Autoimunitní proces může být jak buněčného, tak humorálního typu. Buněčně zprostředkovanou reakci charakterizuje destruktivní zánět, způsobený T_C a T_H lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů. Takový způsob se uplatňuje například u revmatoidní artritidy. Humorální reakce je typická tvorbou patogenních autoprotilátek, především IgG izotypu (produkovaných B-lymfocyty), které se na tkáňovém poškození podílejí cytotoxickými mechanismy nebo ukládáním imunokomplexů. V některých případech mohou autoprotilátky působit funkční změny buňky či proteinu, na který se váží.

Autoimunitní choroby tak lze analogicky k výše uvedenému schématu klasifikovat dle převažujícího mechanismu poškození na:

působené buněčnými složkami,

působené protilátkami.

K prolomení autotolerance, schopnosti organismu tolerovat struktury jemu vlastní, dochází obvykle kombinací několika činitelů:

působených vlivy vnitřními - genetickými, hormonálními.

působených vlivy vnějšími - faktory zevního prostředí

Charakter autoimunitních chorob je tedy multifaktoriální, tuto skutečnost potvrzují výsledky studií, které zkoumaly incidenci daného onemocnění mezi páry monozygotních dvojčat. Hořejší a Bartůňková udávají, že konkordance u různých autoimunitních onemocnění variuje mezi 25-70%. K autoimunitním chorobám zmínění autoři dále poznamenávají: Klinické onemocnění stejného charakteru u různých jedinců může být způsobeno různými příčinami a naopak, stejný genetický defekt může mít různé klinické manifestace v závislosti na dalších faktorech [1].

Mezi hlavní příčiny ovlivňující vznik a průběh chorob z autoimunity patří:

Genetické aspekty autoimunity.

Primární úlohu mezi endogenními příčinami autoimunitních chorob hrají faktory genetické. Naznačují to familiární studie prokazující zvýšenou frekvenci imunologických abnormalit u příbuzných nemocného. Za rozvoj autoimunitních chorob zodpovídá zpravidla více genů. K nejvýznamnějším patří geny HLA – komplexu, geny pro jednotlivé složky komplementu, geny kódující cytokiny, geny pro T – buněčné receptory, geny pro těžký řetězec IgG a další.

Geny HLA komplexu - u řady chorob je prokázána asociace s určitým haplotypem nebo alelami MHC (HLA) I. i II. třídy. Častá asociace různých onemocnění se stejným MHC alotypem potvrzuje domněnku, že dědičná je pouze dispozice k onemocnění. Případná manifestace choroby pak záleží na konkrétních podmínkách vnějšího prostředí.

Geny kódující cytokiny - předpokládá se, že v patogenezi některých chorob z autoimunity hraje úlohu defektní regulace cytokinové produkce, deficit nebo nadbytek určitého cytokinu může vyvolat onemocnění, patrně z důvodu poruchy T_H1 vs. T_H2 regulace.

U osob disponovaných k vývinu autoimunitní nemoci se uplatňují polymorfizmy v genech pro TNF či IL-10.

Geny řídící a regulující apoptózu - mutace v genech pro molekuly účastnící se apoptózy (Fas, FasL, Bcl-2, CTLA-4) jsou příčinou určitých autoimunitních chorob. V případě defektní apoptózy aktivovaných lymfocytů nedochází k ukončení imunitní reakce.

Geny pro jednotlivé složky komplementu - poruchy těchto genů vedou ke vzniku buněčných, ale i humorálních imunodeficiencí, které jsou v příčinné souvislosti s autoimunitními patologiemi.

Polymorfismus v genech pro T- buněčné receptory (TCR) a H – řetězce imunoglobulinů - u některých chorob (SLE) byla zjištěna vazba na určité alely těchto genů.

Role autogenů - termín autogen byl navržen jako analogie termínu onkogen, protože se u nich předpokládá podobný účinek. Autogen je definován jako lidský, virem zachycený gen, který po opětovném proniknutí do genomu hostitele může indukovat poruchu autoimunity. Autogeny nemusejí reprezentovat fixní genetický defekt, spíše jde o poruchu spouštěnou endogenními vlivy. Původní funkcí autogenu mohla být modulace běžné obranné imunitní reakce [2].

Hormonální vlivy

Významná převaha ženských pacientů, nárůst incidence autoimunitních chorob a jejich intenzity v průběhu dospívání, po porodu a naopak zmírnění během gravidity; tyto skutečnosti poukazují na zvláštní úlohu pohlavních hormonů v etiopatogenezi autoimunitních poruch. Je známo, že estrogény inhibují vazbou na receptory T-buňky a umožňují tak zvýšenou produkci protilátek B-buňkami [3]. U autoimunitně nemocných pak dochází také k poruchám sekrece dalších hormonů, je narušen vztah mezi imunitním systémem, hypotalamo-hypofyzo-adrenokortikální a laktotropní osou.

Faktory zevního prostředí

Z vnějších faktorů se v etiopatogenezi autoimunitních onemocnění uplatňují především infekce, stres, farmaka a jiné chemikálie a UV záření. Zejména infekčnímu agens je přisuzován největší podíl na indukci autoimunity, přestože žádné prozatím není přímo spojováno s konkrétní chorobou. Stresové faktory se uplatňují zejména aktivací

neuroendokrinní osy a hormonální dysbalanci. Léky a UV záření se mohou na vzniku autoimunity podílet modifikací autoantigenů a porušením regulačních mechanismů [1].

2.2 HLA systém

2.2.1 Definice

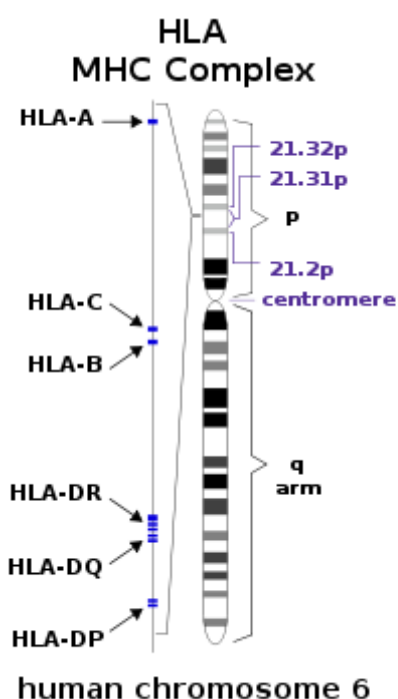
HLA (human leukocyte antigens), hlavní histokompatibilní systém (MHC major histocompatibility complex) člověka představuje soubor genů a jimi kódovaných proteinů, které podmiňují tkáňovou slučitelnost (histokompatibilitu) a plní integrující úlohu při zajišťování imunologické homeostázy organismu. HLA membránové glykoproteiny se nalézají na povrchu imunitních buněk, zajišťují prezentaci antigenu (jeho fragmentů) T-lymfocytům a plní tak nezbytný předpoklad pro rozvoj účinné imunitní odpovědi [4]. MHC reprezentuje vrchol organizace fungování imunitního systému, fylogeneticky se ve vývoji imunity objevuje teprve u obratlovců. Lidské histokompatibilní antigeny popsal poprvé v r. 1956 Jean Dausset a za tento objev obdržel Nobelovu cenu. Kromě hlavního histokompatibilního systému (MHC) existuje v rámci živočišného druhu řada systémů vedlejších. K charakteristickým vlastnostem MHC patří komplexnost a vysoký stupeň polymorfizmu, schopnost regulace imunitní odpovědi, příslušnost k imunoglobulinové rodině a zodpovědnost za imunochemickou originalitu jedince v rámci populace.

2.2.2 Genová oblast

Genová oblast HLA komplexu, v r. 1999 kompletně zmapovaná Geraghtym a spol., se nalézá na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.31), zaujímá úsek dlouhý 3600 kb (3,6cM), tedy přibližně jednu tisícinu genomu. Obsahuje 224 genů; 128 funkčních genů a 96 pseudogenů a patří k regionům s nejvyšší genovou hustotou. Odhaduje se, že asi 40% z exprimovaných genů ovlivňuje procesy imunitní odpovědi [5]. Lokusy HLA genů se rozdělují na klasické (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) a neklasické (HLA-E, HLA-F, HLA-G), které vykazují omezenou buněčnou distribuci a nižší stupeň polymorfizmu. Oficiální nomenklatura WHO podřazuje geny determinující strukturně a funkčně odlišné molekuly do tří tříd: I., II. a III. Geny I. a II. třídy kódují samotné molekuly podílející se na imunologickém rozpoznávání, geny III. třídy určují další molekuly zapojené do imunologických reakcí: složky komplementu (C2, C4A, C4B) a properdin faktor B (Bf). Uvnitř regionu HLA III. třídy jsou dále lokalizovány geny, které funkčně nepatří mezi vlastní geny III. třídy a nověji jsou označovány jako geny HLA IV.

třídy. Jde o geny pro 21-hydroxylázu (21A, 21B), protein tepelného šoku 70 (Hsp 70) a tumor nekrotizující faktor (TNF α , TNF β).

Mezi geny I. třídy patří geny HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G a pseudogeny HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L. HLA-A, HLA-B, HLA-C geny kódují klasické transplantační antigeny (I.a), přítomné na membránách všech buněk organismu s výjimkou erytrocytů. Molekuly I.a jsou tvořeny dvěma nekovalentně vázanými glykoproteinovými alfa a beta řetězci. Lehký beta řetězec je invariantní beta 2 mikroglobulin kódovaný genem chromozomu 15. Těžký polymorfní alfa řetězec kódují geny HLA-A, HLA-B, HLA-C. Geny HLA-E, HLA-F, HLA-G určují neklasické antigeny I.b třídy s podobnou strukturou, ale s omezenou tkáňovou distribucí [6].



Obr. 1: Umístění HLA oblasti na chromozomu (upraveno dle www.wikipedia.org)

Region, ve kterém se nalézají geny II. třídy bývá též označován jako D a dělí se na tři podoblasti (HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP), ze kterých jsou kódovány příslušné molekuly. Tyto glykoproteiny mají omezenou tkáňovou distribuci, jsou exprimovány na monocytech, B-lymfocytech, makrofázích, dendritických a Langerhansových buňkách. Skládají se ze dvou nekovalentně asociovaných, transmembránových podjednotek alfa a beta. Oba řetězce jsou determinovány geny HLA systému: řetězec alfa genem A (DRA1, DQA1, DPA1), řetězec beta genem B (DRB1, DQB1, DPB1). Struktura D oblasti je složitá, nalézá se zde několik pseudogenů, lokalizují se sem geny HLA-DNA, HLA-DOB,

HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-LMP2,7 a HLA-TAP1,2, jejichž produkty se účastní při zpracování a transportu cizorodého antigenu.

Uprostřed HLA oblasti se nachází úsek o velikosti 1 Mb, ve kterém bylo identifikováno na 70 genů, které se funkčně ani strukturně nepodobají HLA molekulám. Navzdory této skutečnosti se vžilo označení geny III. třídy, přičemž některé geny původně zařazené do této třídy jsou nověji označovány jako geny IV. třídy (viz. výše).

2.2.3 HLA nomenklatura

Vysoký stupeň polymorfizmu HLA systému zohledňují platné zásady pro označování HLA alel dané Světovou zdravotnickou organizací WHO (WHO nomenklatura). Princip je jednoduchý: Každá alela je definována písemným označením lokusu následovaným hvězdičkou (HLA-DRB1*), a poté kombinací 4 číslic (*0401), přičemž první dvojčíslí určuje sérologickou specifitu dané alely, druhé pak označuje alelu na základě její aminokyselinové sekvence. Případné páté číslo charakterizuje tzv. "tichou" variantu alely, tzn. záměnu nukleotidů bez změny aminokyselinové sekvence.

2.2.4 Dědičnost HLA

HLA geny jsou děděny autozomálně kodominantně a vykazují mendelistický typ dědičnosti. Počet rekombinací v HLA systému je řídký, vyskytuje se přibližně v 1 % případů a častěji u žen. Celá oblast od HLA-F až po HLA-DP se přenáší z rodičů na potomstvo jako haplotyp. V rámci rodiny se mohou vyskytnout teoreticky 4 různé kombinace rodičovských haplotypů, takže sourozenci mohou být navzájem buď HLA identičtí, haploidentičtí (mají jeden haplotyp, v druhém se liší), anebo rozdílní. Rodiče jsou vůči svým dětem vždy haploidentičtí [5]. Z genetického hlediska významný fenomén představuje existence vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) v rámci HLA. Mnoho HLA genů se nalézá v tak těsné blízkosti, že se přenášejí z rodičů na potomky téměř vždy společně. V důsledku této skutečnosti se v populaci vyskytují některé kombinace alel různých genů častěji, než by se očekávalo. Vazebná nerovnováha je významným faktorem v asociaci HLA antigenů s chorobami, protože mnohá onemocnění se v jejím důsledku váží s více antigeny.

2.2.5 Funkce HLA systému

Základní funkcí MHC glykoproteinů je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou (zejména MHC gp I.), resp. pohlcených buňkou (zejména MHC gp II.) a vystavovat je na buněčném povrchu tak, aby byly potenciálně rozeznatelné T-lymfocyty [1].

Glykoproteiny I. třídy vážou na buňce, která prezentuje antigen, cizorodé endogenní peptidy (pocházející z vnitřního prostředí buňky) produkované viry, intracelulárními mikroorganismy, či nádorovými buňkami a prezentují je CD8⁺ cytotoxickým T-lymfocytům.

Glykoproteiny II. třídy vážou extracelulární antigenní peptidy exogenního původu a prezentují je CD 4⁺ pomocným T-lymfocytům. Aktivace tohoto druhu lymfocytů vede ke spolupráci s B-lymfocyty, diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky a produkci protilátek proti antigenu vyvolávajícímu imunitní odpověď.

2.2.6 Polymorfismus MHC glykoproteinů

Většina MHC glykoproteinů se vyznačuje extrémním polymorfismem, v populaci převažuje značné množství (až stovky) různých alelických forem jednotlivých izotypů. Tyto alelické formy se odlišují záměnou jedné či několika aminokyselin ve vazebném místě pro peptid (případně v jeho okolí); různé varianty tak váží různé typy peptidů. Vysoký stupeň polymorfismu se vyvinul pravděpodobně v důsledku selekčního tlaku v průběhu evoluce a představuje významný ochranný prvek na úrovni jedince i populace. Polymorfismus HLA systému se využívá v kriminalistice, paternitních sporech, komplikace působí při typizační praxi, zejména při výběru optimálního dárce orgánů a kostní dřeně.

2.2.7 Laboratorní metody určování HLA

Ke stanovení HLA typu vyšetřovaného jedince (HLA typizace) se užívají tři skupiny metod: sérologické, buněčné a molekulární [7].

Sérologická typizace vychází z reakce antigen – protilátka – komplement, buněčné metody pak využívají smíšených lymfocytárních kultur. Obě historicky starší metody definují HLA

molekuly exprimované na buněčných membránách (fenotyp) a postihují jen část polymorfizmu HLA.

Molekulárně – genetické metody jsou senzitivnější a umožňují stanovit genotyp jedince. Pro genotypizaci existuje řada použitelných DNA technik [8]. Nejužívanější je PCR-SSP (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery), přičemž se extrahovaná DNA využívá jako substrát v sadě PCR reakcí, kde každá obsahuje pro určitou alelu (resp. sadu alel) specifický primerový pár. Reakce se hodnotí elektroforeticky, každá kombinace HLA alel dává typický elektroforetický obraz. Mezi užívané metodiky dále patří PCR-SSO (PCR reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy), pozitivní reakce se vizualizuje pomocí chemiluminiscence. K přesné typizaci se užívá PCR-SBT techniky (Sequencing Based Typing) čili sekvencování. V budoucnu lze předpokládat rutinní využití metodik DNA analýzy pomocí DNA mikročipů [9]. Výsledky získané DNA analýzou lze ve většině případů převést na výsledky získané sérologicky. Převodní tabulku podává např. The HLA dictionary [10].

2.2.8 HLA a autoimunitní onemocnění

U autoimunitních onemocnění se některé HLA antigeny vyskytují častěji než u zdravé populace. Průkazná souvislost určitých HLA specifit s daným onemocněním se označuje jako asociace, matematicky ji definujeme dle hodnoty relativního rizika (RR). Doposud byla popsána vazba s více jak pěti sty nosologickými jednotkami, u přibližně čtyřiceti chorob je asociace výrazná.

Mezi nejvýznamnější patří vztahy mezi ankylozující spondylitidou (HLA-B27), narkolepsií (HLA-DQ6), celiakií (DR2), sclerosis multiplex (DQ6), juvenilním diabetem (DQ8/DQ2), psoriázou (HLA-B13, B17,Cw6) a subakutní tyreoiditou (HLA-DR3, DR4). U bílé populace byla prokázána významná asociace tzv. 8.1 nebo též A1-B8-DR3 ancestrálního haplotypu s širokou škálou autoimunitních chorob a imunologických fenotypů (SLE, DM I., myastenia gravis).

Přestože bylo postulováno mnoho teorií objasňujících vazbu chorob s HLA antigeny, přesný mechanismus podmiňující toto spojení prozatím odhalen nebyl.

2.3 Revmatoidní artritida

Polyarthritis progressiva, chronická polyartritida, chronický zánětlivý kloubní revmatismus

2.3.1 Charakteristika onemocnění

Zánětlivé, chronicky progredientní, systémové autoimunitní, značně heterogenní onemocnění nejasné etiologie, s neuspokojivě popsanou patogenezi. Příčiny vzniku jsou multifaktoriální, včetně polygenní genetické predispozice. Pro významný podíl psychických činitelů v etiopatogenezi je choroba klasifikována jako psychosomatická.

Autoimunitně indukovaný zánět infiltruje synovii kloubů, burz a šlach, destruuje chrupavku i kost za vzniku deformit postižených kloubů. Systémové projevy zahrnují tvorbu proteinů akutní fáze a produkci autoprotilátů. Klinicky manifestní je symetrická chronická polyartritida s variabilní přítomností mimokloubních příznaků. Nemoc výrazně zkracuje život a vede k disabilitě.

2.3.2 Epidemiologie

Onemocnění se vyskytuje celosvětově. Incidence RA se udává 0,1 - 0,2 / 1000 mužů, 0,2 - 0,4 / 1000 žen. Prevalence kolísá od 0,5% až 1,0%. Vyšší, 5 - 7%, je u některých etnik S. Ameriky (Pima, Yakima a Chippewa), nízká u venkovského obyvatelstva v Africe (Nigérie), jihovýchodní Asii a některých oblastech Číny a Japonska. U kavkazské populace v Evropě se pohybuje většinou kolem 1%. Převažují ženy s poměrem 2-4 : 1 k mužům [2,11]. Choroba postihuje všechny věkové skupiny, nejčastěji ženy v 5. dekádě života.

2.3.3 Genetika RA

RA je polygenně podmíněné onemocnění s vlivem genetické informace na riziko vzniku a závažnost průběhu. Genetickou predispozici potvrzují dvojčecí studie, přičemž prameny se v udávané konkordanci liší. Zatímco Němec konstatuje 10 – 15% konkordanci u monozygotních (MZ) a 5 – 7% u dizygotních (DZ) dvojčat [12]. Newton et al. uvádějí 12 – 15 % pro MZ, a až čtyřikrát nižší procento pro DZ konkordanci [13]. Zmíněná data ukazují na heritabilitu mezi 40 – 60 %. Výzkumy zahrnující dvojčata trpící lehčí formou

nemoci shledaly nižší údaje MZ konkordance. Tato skutečnost potvrzuje vazbu HLA-DRB1 genu s těžším průběhem onemocnění.

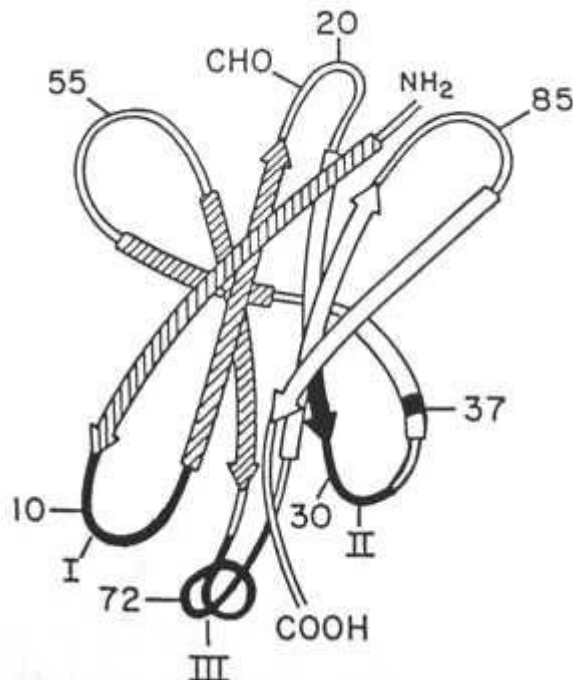
Hlavní oblast genomu, prokazatelně asociovanou s RA, představuje hlavní histokompatibilní komplex (MHC - major histocompatibility complex), u lidí označovaný jako HLA (human leukocyte antigen). Nalézá se na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.3), zabírá 3,6 Mb, je rozdělen do tří tříd a reprezentuje region s vysokou genovou hustotou, čítající přibližně 220 genů, plnících především imunoregulační funkce. První třída leží na telomerickém konci HLA a obsahuje geny HLA-A, HLA-B a HLA-C, kódující HLA glykoproteiny I. Druhá třída, rozdělená na HLA-DR, HLA-DP a HLA-DQ, kóduje alfa a beta řetězce HLA molekul třídy II. Oblast třetí třídy je situována mezi třídami I. a II. a její součástí jsou např. geny pro některé složky komplementu, cytokiny (TNF) a stresové proteiny (heat shock proteins). Někteří autoři ji považují za druhý nejvýznamnější lokus ve vztahu k RA.

Podstatný podíl genetického rizika (30 – 50 %) však připadá na geny HLA systému třídy II [14]. Již roku 1978 popsal Stastny s využitím buněčné a sérologické typizace asociaci RA s antigenem DR4 (HLA-DW-4), která platí pro většinu populací [15]. Rovněž další práce potvrdily, že 60 – 70 % RA pacientů je ve srovnání s 20 – 25 % nosičstvím u kontrolní zdravé populace HLA-DR4 pozitivní [16,17]. Vencovský udává, že až 90 % nemocných s RA je nositelem některých alel HLA-DR4 či HLA-DR1, přičemž v kontrolní populaci je frekvence těchto alel kolem 25 % [18]. Newton et al. zmiňují 30% pozitivitu zdravé britské populace pro DRB1*04 alely [13]. Novota et al., kteří studovali problém rizikových DRB1 alel u DM I. typu, uvádějí 14% alelovou frekvenci DRB1*04 u zdravé kontrolní české populace [19].

Rozvoj genotypizačních metod s vyšším rozlišením prokázal nerovnoměrnou asociaci různých HLA-DR4 alel s chorobou. Mezipopulační studie navíc konstatovaly vztah RA s dalšími antigeny: DR1 (Židé), DR 10, DR6 a DR 14 (Indiáni Yakima) [20]. Molekulární studie dále specifikovaly vybrané subtypy (alely), které se s RA pojí. HLA-DRB1*01 a HLA-DRB1*10 jsou asociovány s RA u některých indiánských kmenů, evropských národů (Řekové, Španělé), ale i Židů. U amerických indiánů Yakima, u nichž se RA vyskytuje s vysokou prevalencí, byla nalezena vazba alely HLA-DR6 (HLA-DRB1*1402) s chorobou [11]. Kuvajtské Arabové, trpící RA, jsou častými nositeli HLA-DRB1*03. Populace tamilských a hindských Indů, přesídlených do jižní Afriky, vykazuje asociaci

s DRB1*10. U aljašských indiánů Tlingit se s RA pojí DRB1*1402 [21,22,23]. Nízká frekvence DRB1*04 byla zaznamenána v populaci severní Itálie [24,25]. U Řeků a izraelských Židů jsou ve vztahu k nemoci běžně prokazovány alely DR10 a DRB1*01 [26]. Lze tedy konstatovat, že asociace s jednotlivými alelami DR lokusu je závislá na zkoumané populaci pacientů.

Pro vazbu některých forem DRB1 genu s chorobou podali Gregersen a spol. jednotlící hypotézu tzv. sdíleného epitopu (SE), když prokázali, že alely s RA asociované kódují společnou sekvenci pěti aminokyselin (QRRAA, RRRAA, QKRAA) ve třetí hypervariabilní oblasti (HVR3) DRB1 řetězce [27]. Vyšetření sekvenčních vztahů těchto s chorobou asociovaných DRB1 alel ukázalo přítomnost sdílené sekvence na pozici 70-74 DRB1 (beta řetězec molekuly, pozn. autora) řetězce – tzv. sdíleného epitopu [28]. Zmíněný aminokyselinový motiv konstruuje alfa šroubovicovou doménu, která vytváří jednu stranu vazebného místa molekuly antigenu, jež může mít vliv na jeho prezentaci. Nukleotidovou sekvenci pro SE nesou následující alely: HLA-DRB1* 0401, 0404, 0405, 0408, 0409, 04010 (HLA-DR 4), HLA-DRB1*0101, 0102 (HLA-DR1), HLA-DRB1* 1001 (HLA-DR 10), HLA-DRB1* 1402, HLA-DRB1*09.



Obr. 2: Prostorová struktura β řetězce HLA molekuly II. třídy. Ve třetí hypervariabilní oblasti vytváří 5 AK α helikální strukturu. Tento sekvenční motiv 5 AK (QKRAA/QRRAA) na pozicích 70 – 74. kódují některé alely DRB1 genu. Úsek je označován jako tzv. sdílený epitop (shared epitope, SE) (Upraveno dle Gregersen et al. [27])

Naproti tomu však existují i s RA negativně asociované alely, které mají protektivní úlohu a před vznikem onemocnění chrání (DRB1* 0103, *0402, *0802, *1302) [29]. Revirion et al. přiznávají protektivitu alelám HLA-DR8, DR11 a DR13 [30], Němec navíc tvrdí, že jejich přítomnost poskytuje ochranu nezávisle na výskytu anti-CCP protilátek [31].

Sdílený epitop (SE) se u kavkazské a asijské populace považuje za s RA primárně asociovaný, alely jej kódující lze nalézt u 85 - 96 % postižených [32,24]. Jejich přítomnost je spojena s vyšší vnímavostí ke vzniku RA a závažnějším průběhem choroby. U různých etnických skupin se však predominantní, s chorobou asociované alely, značně liší: U bělošské (kavkazské) populace převažují alely *0401 a *0404, u Japonců *0405, u izraelských Židů *0101. Asociace s HLA-DRB1*09 byla popsána u chilských, japonských, ale i bělošských revmatoidních artritiků [2].

Tabulka 1: DRB1 alely kódující SE

HLA subtyp	Alely kódující SE
HLA-DR4	0401, 0404, 0405, 0408, 0409, 0410
HLA-DR1	0101, 0102
HLA-DR6	1402
HLA-DR10	1001

Nosičství HLA-DRB1*0401 alely může determinovat závažnější průběh choroby s extraartikulárními symptomy, zejména, je-li subjekt pro danou alelu homozygotní. Zdá se tedy, že v míře rizika a závažnosti RA se uplatňuje efekt genové dávky asociovaných HLA alel [12]. Asociační síla různých DRB1 alel kolísá, určité kombinace skládající heterozygotní genotyp, např. DRB1*0401/0404, nesou vysoký stupeň rizika onemocnění a vyskytují se u prognosticky závažných forem nemoci. Newton et al. udávají, že nosičství DRB1*0401/DRX, kde X znamená alelu nekódující SE, vykazuje relativní riziko (RR) rozvinutí choroby 4,7. Pro další kombinace platí: DRB1*0404/DRX RR=5, DRB1*0401/*0401 RR=18,8, DRB1*0401/*0404 RR= 31, DRB1*0404/*0404,5,8 RR= 36,2. Absolutní riziko pro nositele některé z SE kódujících alel je následující: pro DRB1*0401 1:35, pro DRB1*0404 1:20, pro DRB1*0101 1:80 a pro DRB1*0401/*0404 1:7 [13].

Doposud byly podány dva systémy klasifikace SE kódujících HLA-DRB1 alel. Starší z nich diferencuje následovně: HLA-DRB1*0101, *0405, *0408, *1001 a *1402 označuje

jako E₁ alely, HLA-DRB1*0401 jako E₂ alelu, HLA-DRB1*0102 a *0404 jako E₃ alely a ostatní HLA-DRB1 alely jako alely E_X [26]. Novější, du Montcelovo dělení, klasifikuje HLA-DRB1 alely na základě přítomnosti či nepřítomnosti sekvence AK RAA na pozici 72-74 do dvou skupin: S a X. S alely pak třídí, vzhledem k přítomnosti AK na pozici 71, do 4 skupin: S₁ pro ARAA a ERAA, S₂ pro KRAA, S₃ pro RRAA a X pro sekvence neobsahující motiv RAA. Toto rozdělení navíc předpokládá asociaci AK na pozici 70 s vnímavostí ke vzniku RA. Přítomnost kyseliny asparagové (D) působí pravděpodobně protektivně, narozdíl od přítomnosti glutaminu (Q) a argininu (R). HLA-DRB1 alely jsou tedy dále děleny na S_{3D} s motivem DRRAA a S_{3P} s motivy QRRAA a RRRAA [33]. Du Montcelova klasifikace vykazuje lepší korelaci HLA-DRB1 alel s vnímavostí k RA a se závažností jejího průběhu, navíc odlišuje alely rizikové a protektivní [31]. HLA-DRB1 varianty asociované s vnímavostí ke vzniku RA řadí následovně: Rizikové alely určující závažnější průběh choroby reprezentuje skupina S₂, neutrální alely skupiny S_{3P}, X a S₁, protektivní alely skupina S_{3D} [34].

Hypotéza sdíleného epitopu předpokládá, že zvláště HLA molekuly II. třídy se přímo podílejí na patogenezi choroby, přesný mechanismus však zatím zůstává nejasný. Přesto přítomnost SE nepředstavuje ani nutnou, ani dostačující podmínku pro vznik onemocnění. Některé studie pacientů s lehčí formou RA navíc asociaci s HLA-DRB1 alelami neprokázaly [13]. HLA-DR asociace s RA byla též rozsáhle studována s ohledem na fenotypové projevy choroby: rozvoj kostních erozí a pozitivitu pro revmatoidní faktor (RF) a anti-CCP protilátky. Vazba s přítomností RF se ukázala jako nekonstantní, většina studií však potvrzuje vztah mezi nosičstvím alel sdíleného epitopu a rychlejším rozvojem erozí. Van Gaalen et al. prokázali, že pozitivita pro sdílený epitop je v silné vazbě se zvýšenými hladinami anti-CCP protilátek [35]. Tuto skutečnost potvrdili Irigoyen et al., když na souboru více jak 1700 RA pacientů shledali silnou asociaci mezi SE a anti-CCP, nezávislou na pozitivitě RF [36]. Naopak u RF konstatují pouze slabou vazbu s SE, na anti-CCP nezávislou. Na těchto faktech je založena tzv. „citrulinovaná SE hypotéza“. Ding et. al. došli k závěru, že anti-CCP pozitivní pacienti představují samostatnou genetickou podskupinu v rámci RA [37]. Další nálezy navíc dokazují, že přítomnost RF a anti-CCP autoprottilátek je asociována s nosičstvím PTPN 221858C/T polymorfizmu [38,39,40,41]. Dle Johanssona et. al. pak kombinace nosičství 1858T varianty genu PTPN22 a séropozitivity anti-CCP autoprottilátek dává 100% specifitu pro RA a významně predikuje brzký rozvoj nemoci [39]. Výše zmíněná fakta potvrzují např. Orozco et. al. [42].

Jiné práce pak prokázaly asociaci HLA-DR3 alely s rizikem vývoje anti-CCP negativní RA [43]. Kromě této skutečnosti byla zjištěna vazba HLA-DR3 s rizikem vývoje anti-CCP negativní, nediferencované artritidy, ne však s rozvojem anti-CCP pozitivní formy této nemoci. Nedořešena tak zůstává otázka, zda alela HLA-DR3 působí samostatně nebo jako součást širší vazebné nerovnováhy. Domněnku o vazbě s různými specifitami podporuje v minulosti podaný průkaz vztahu HLA-DR3 k jiným autoimunitním chorobám, jakož i rozdílná asociace s produkcí některých autoprotilátek [44,45,46].

Zmíněná fakta obracejí pozornost ke vztahu RA a A1-B8-DR3 haplotypu (SE nekódující haplotyp) u kavkazské populace, asociovaného se širokou škálou autoimunitních procesů a imunologických fenotypů. Nálezy mohou též poukazovat na odlišný patogenetický mechanismus anti-CCP pozitivní a anti-CCP negativní RA.

Existence nezanedbatelného procenta SE negativních nemocných obrátila pozornost genetiků k podílu neděděných maternálních HLA antigenů (NIMA) na vnímavosti k RA. Předpokládá se, že pacienti nenesoucí alely pro SE mohli být během fetálního vývoje vystaveni působení NIMA SE pozitivních HLA antigenů, eventuálně u nich může expozice v případě mikrochimerizmu přetrvávat.

Pokusy o přesné stanovení genů podílejících se na vzniku RA komplikuje především rozsah a složitost vazebné nerovnováhy uvnitř MHC. Sérologicky určené antigeny DQ3 a DR4 jsou u bělošské populace s RA silně asociované. Na základě tohoto faktu byla vyslovena hypotéza, že DQB1*03 a *05 jsou ve skutečnosti pravé alely ovlivňující vnímavost k nemoci, a že DRB1 vazba s chorobou je pouze důsledkem vazebné nerovnováhy s těmito alelami. Domněnku podpořil výzkum indukované artritidy na HLA-DQ transgenních myších modelech. Některé lidské srovnávací studie pak rovněž konstatovaly přímou úlohu DQ alel v rozvoji RA [47]. Milicic et al. však ve studii souboru 685 RA nemocných a více jak 14 000 zdravých dárců kostní dřeně nepotvrdil podíl DQB1 alel (nezávislých na SE) na vzniku choroby [29]. Několik dalších studií však prokázalo asociaci HLA-DRB1*0401 – DQB1*0301 haplotypu s těžší formou onemocnění, pozitivitou IgM RF a vyšším stupněm kloubních deformit [48]. Otázka zda a jakým způsobem ovlivňují DQB1 alely vnímavost k nemoci tak zůstává otevřená. Výzkum je komplikován zejména silnou vazebnou nerovnováhou MHC genů, problematičtější je navržení studie tak, aby nerovnováhu plně kontrolovala.

V posledních letech byl zdůrazňován význam centrální HLA oblasti (HLA III.), jež obsahuje nejméně 50 genů, které se mohou s onemocněním pojít. Tyto geny jsou odvozeny z rodového A1-B8-DRB1*03 neboli 8.1 haplotypu (SE nekódující haplotyp), který se váže k široké škále autoimunitních procesů a imunologických fenotypů. Extenzivně studovány byly zejména geny pro TNF.

Rozvoj vysoce citlivých SNP mapovacích technik jednoznačně prokázal, že DRB1 není jediný MHC gen podílející se na vnímavosti k onemocnění. Problém genetického příspěvku různých MHC genů řešilo již několik starších studií [49,50,51,52]. Jejich závěry potvrdily zejména dva novější výzkumy, které pomocí hustého SNP mapování detekovaly další MHC lokusy asociované s RA [37,53]. Ding et al. předložili přesvědčivé důkazy pro druhou oblast MHC asociovanou s RA, situovanou centromericky k DR a DQ, s maximálním signálem na DPB1 lokusu. Další signály byly pozorovány též v centrální MHC a v HLA I.A (MICA) oblasti [37]. Lee et al. dospěli za pomoci odlišných postupů k podobným závěrům, navíc pak zachytili silný signál na hranici mezi HLA I. a centrálním MHC, jakož i slabší signály uvnitř HLA I [53]. Tento fakt je v souladu s předchozími údaji získanými typizací mikrosatelitů [51]. MHC region tedy obsahuje kromě DRB1 i další riziková místa, je však třeba provést jejich detailní určení včetně identifikace specifických kauzálních genů.

Vztah k chorobě je zkoumán i u kandidátních genů ležících mimo MHC. Významný příspěvek k problematice genů vázaných s RA dodaly zejména dvě celogenomové asociační studie (GWAS) [54,55]. Dle jejich závěrů vykazuje v kavkazské populaci druhou nejsilnější vazbu s chorobou gen pro tyrosin fosfatázu PTPN22. I jiné výzkumy posledních let dokazují, že polymorfizmy v PTPN22 genu představují riziko pro rozvoj RA, ale též dalších autoimunitních chorob (DM I. typ, SLE, apod.) [56,57]. PTPN22 lokalizovaný na 1.chromozomu (1p13.3-p13.1) kóduje intracelulární fosfatázu specifickou pro lymfoidní linii buněk (Lyp). Ta se váže na SH3 doménu Csk kinázy, což umožňuje supresi kináz vyvolávajících aktivaci T-lymfocytů. Produkt PTPN22 tedy plní funkci negativního regulátoru T buněk v imunitním systému člověka. Riziková alela 620W nese 1885C>T polymorfizmus, který na aminokyselinové pozici 620 mění kód argininu na tryptofan. Výskyt 620W alely vykazuje dramatické frekvenční mezipopulační rozdíly s nápadným gradientem stoupající frekvence od jihu k severu u evropské populace, u Asiátů se naopak téměř nevyskytuje.

Za třetí nejvýznamnější oblast ve vztahu k RA je dle nejnovějších celogenomových asociačních dat považován TRAF1-C5 region (TNF Receptor Associated Factor 1 - Complement 5) lokalizovaný na chromozomu 9 [55]. TRAF 1 náleží do TRAF rodiny, skupiny adaptorových proteinů, vážících TNF receptory a sehrávajících úlohu v transdukcí signálu. Molekuly jsou součástí signálních drah účastnících se buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy, kostní remodelace a aktivace či inhibice cytokinů. C5 gen kóduje složky komplementu 5, které mohou přispívat tkáňovou destrukcí a mobilizací zánětlivých a synoviálních buněk k rozvoji onemocnění. Sdružení TRAF 1-C5 oblasti s chorobou poprvé odhalily dva vzájemně nezávislé výzkumy [55,58]. Replikační studie kombinující data z rozsáhlé britské kohorty s údaji získanými WTCC (Wellcome Trust Case Control Consortium) [54] asociaci potvrdila, přičemž podala silnější důkazy pro vazbu TRAF1-C5 s anti-CCP pozitivní formou nemoci [59]. Maximální genetický signál byl zaznamenán mezi TRAF 1 a C5 geny a potenciálně zahrnuje též třetí gen v oblasti - PHF19 (plant homeodomain finger protein) - ,podílející se na diferenciaci a řízení buněčného cyklu. Vzhledem ke své funkci však PHF19 není považován za přesvědčivého kandidáta. Otázku, která genová varianta TRAF1-C5 oblasti je za zvýšenou vnímavost k RA odpovědná, tak s konečnou platností zodpoví až budoucí výzkum.

Relativně mírné sdružení s chorobou s odhadovaným relativním rizikem 1.25 vykazuje gen pro STAT4 (signální snímač a aktivátor transkripce 4) [60]. STAT4 je zástupcem STAT rodiny transkripčních faktorů, kterou tvoří šest hlavních členů, každý s úlohou v signalizaci cytokinových receptorů [61]. STAT 4 představuje klíčovou molekulu pro IL-12 (interleukin 12) signalizaci v T a NK buňkách, která vede k produkci interferonu gama a diferenciaci CD4 T buněk do Th1 fenotypu. Objev STAT 4 asociace byl výsledkem SNP mapování dlouhého raménka chromozomu 2, respektive 2q7 oblasti. Remmers et al. podali jednoznačný důkaz vazby STAT 4 s RA a SLE [62]. Asociace s oběma chorobami je navíc nalézána jak u kavkazské, tak i asijské populace [63]. Poté, co jiná studie poukázala na vazbu STAT 4 se Sjögrenovým syndromem [64], se zdá být pravděpodobné, že STAT 4 přispívá k patogenezi dalších autoimunitních onemocnění. Podrobné mapování a resekvenace STAT 4 rizikového haplotypu naznačily, že kauzální alely mohou být umístěny v rámci třetího intronu genu [60]. Myši, u kterých byl gen pro STAT4 vyřazen z funkce, jsou odolné vůči experimentálně navozené artritidě. Hyperexprese STAT 4 v dendritických buňkách synoviální tkáň RA pacientů mizí po léčbě DMARDs. Tato fakta naznačují, že by STAT4 mohl být využit jako potenciální cíl terapeutického zásahu.

Další oblast s vazbou k RA reprezentuje 6q 23 region, přičemž asociaci potvrdily dva vzájemně nezávislé výzkumné týmy [54,65]. S chorobou spojené SNP se nalézají ve vzdálenosti více než 150kb od nejbližších genů: TNF α indukovaného proteinu 3 a oligodendrocytového transkripčního faktoru 3. TNF α indukovaný protein 3, známý též jako A20, je zinc-finger protein, který svým působením v cytoplasmě reguluje a omezuje trvání NF κ B signálů, které jsou vyvolané jak TNF, tak Toll-like receptory. Recentní nálezy naznačují, že A20 hraje rozhodující roli v autoimunitních procesech, a představuje tak atraktivního kandidáta pro RA, ale i další autoimunitní choroby.

Pro asijskou populaci platí asociace mezi RA a genem pro PADI4 (peptidyl arginin diimináza) [66]. V kavkazské populaci má PADI4 mnohem slabší vliv a vazba je zde obtížně prokazatelná. PADI4 se nachází na krátkém raménku chromozomu 1 (1p36.99) a náleží do rodiny „padi“ – genů kódujících enzymy, které se účastní posttranslační přeměny argininových zbytků na citrulin, jedné ze základních reakcí při rozpoznávání autoantigenů autoprotilátkami u RA. Tato funkce může souviset s produkcí anti-CCP protilátek, která je charakteristická pro většinu RA nemocných. Příčinná alela PADI4 genu nebyla dosud stanovena.

Region 4q27 hraje obecnou úlohu v rozvoji autoimunitních procesů. Oblast je ve vazbě s celiakií a DM I., ale i psoriatickou artritidou a Gravesovou chorobou [67,68]. Asociaci s RA prokázali Zhernakova et al., kteří zároveň potvrdili vazbu s DM1 [69]. Oblast 4q27 obsahuje 4 geny, z nichž dva, IL-2 a IL-21, mohou mít význam v patogenezi RA. Oba geny kódují příslušný interleukin, protein z rodiny cytokinů. IL-21 má silný regulační účinek na buňky imunitního systému, včetně NK buněk a cytotoxických T-lymfocytů a indukuje jejich dělení a proliferaci [70]. Nejnovější poznatky zdůrazňují význam IL-21 jako pravděpodobného kandidáta a potenciálního cíle terapeutické intervence.

Kromě výše zmíněných asociací bylo s různým stupněm statistického důkazu popsáno několik dalších genů s vnímavostí k RA, vždy však s předpokládaným nízkým relativním rizikem. Jedním z reprezentantů je např. gen pro cytotoxický protein 4, asociovaný s T-lymfocyty, který pravděpodobně obsahuje skutečné rizikové alely pro RA [60].

V poslední době se ukazuje, že významnou úlohu v rozvoji revmatických chorob hrají epigenetické modifikace. Tyto procesy lze definovat jako dědičné změny genové exprese, při kterých však nedochází k alteraci nukleotidové sekvence [71]. Přestože nejsou fixovány

v DNA kódu, mohou přetrvávat po celý život, mohou však být ovlivněny např. individuálními rozdíly životního stylu [72,73]. Uspokojivě popsány byly typické epigenetické děje s významným vlivem na DNA funkci: metylace DNA a acetylace histonů. Relativně novou vrstvu řízení genové exprese pak představují micro RNA (miRNA). MiRNA je skupina krátkých (20-22 nt) nekódujících RNA, které posttranskripčně upravují stabilitu a translační účinnost cílových messengerových RNA [74]. Doposud bylo identifikováno na 700 lidských miRNA, o nichž se předpokládá, že regulují asi 30% protein kódujících genů lidského genomu [75]. Recentní nálezy zdůrazňují zásadní význam miRNA ve vývoji, homeostáze a funkci vrozené i adaptivní imunity [76]. U revmatických onemocnění hrají miRNA klíčovou úlohu v regulaci hlavních patogenních molekul (tumor nekrotizující faktor), centrálních signálních dráh (typ I interferonové dráhy) a kritických imunoregulačních buněk (regulační T buňky) [77]. Přesná úloha miRNA ve spojení s patologickými projevy však začíná být teprve poznávána. U některých systémových onemocnění byly popsány konstantní abnormality v expresi jednotlivých miRNA typů. Např. synoviální fibroblasty pacientů trpících revmatoidní artritidou (RA) vykazují zvýšenou expresi miR-155, miR-146a a miR-203, exprese miR-124a je naopak snížena. Analýza mononukleárních buněk periferní krve RA nemocných konstatovala hyperexpresi miR-16, miR-132, miR-146 a miR-155 [78]. Zjištěná fakta ukazují na podobný expresní vzorec v obou typech buněk. Některé práce navíc uvádějí, že zvýšená exprese miR-16 a miR-146 koreluje s aktivitou onemocnění [79]. Nejnovější data pak naznačují možnost využití miRNA jako potenciálních diagnostických markerů [80,81].

2.3.4 Etiopatogeneze

Etiologie onemocnění není známa, choroba vzniká spolupůsobením genetických činitelů a faktorů prostředí. Obě složky se podílejí na značné variabilitě a heterogenitě RA. Za hlavní negenetické aktivátory jsou na základě anamnestických dat považovány infekce a stres. Zkoumán byl též podíl reprodukčních a endokrinních faktorů, toxinů, životního stylu a socioekonomických vlivů v rozvoji onemocnění.

Přestože je infekční úloha v etiopatogenezi RA studována řadu let, kauzální vztah k určitému agens nebyl prokázán. Mezi etiologicky nejpravděpodobnější infekty patří některé druhy bakterií (*Mycobacterium*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma arthritidis*, *Yersinia*) a virů (EBV, CMV, HNLV-1, Rubeola, Hepatitida B).

Dostál et al. našli v séru RA nemocných zvýšený titr protilátky proti EB viróze [82]. Podobné výsledky publikoval i jiný výzkum [83]. Vzhledem k častému výskytu artritidy u pacientů s retrovirovou infekcí se uvažuje o účasti retrovirů při spouštění patogenetického imunitního řetězce.

Vyšší prevalence RA mezi ženami, vliv pohlavního dimorfismu, obrací pozornost k významu reprodukčních a hormonálních faktorů v rozvoji choroby. Obecně známým faktem je častější výskyt RA u žen v období před menopauzou. Četné studie se zaměřily na výzkum vlivu těhotenství, kojení a exogenních hormonů ve vývoji RA. Přestože některé práce poukázaly na rizikovost nuliparity ve vztahu k RA [84], jiné tento fakt nepotvrdily [85]. Těhotenství může ovlivnit vzplanutí choroby, jako protektivní faktor však zřejmě nepůsobí [86]. Brennan a Silman však prokázali, že kojení zvyšuje až pětinasobně riziko vzniku RA [87]. Ženy s RA navíc vykazují relativní androgenní deficienci a nižší hladiny testosteronu, rovněž muži s RA se ve srovnání se zdravou populací vyznačují hypotestosteronií [88,89]. Uvažovaný protektivní vliv orálních kontraceptiv na vznik RA nebyl prokázán [90].

Jednoznačně potvrzena byla asociace mezi RA a abusem tabáku [91,92]. Zmíněné práce navíc konstatovaly interakci mezi kouřením a nosičstvím alel sdíleného epitopu. Hypotézu o vlivu kouření jako rizikového faktoru u geneticky disponovaných jedinců postulovali Padyukov et al [93]. Klareskog et al. pak potvrdili vztah mezi SE a produkcí anti-CCP protilátek, navíc však zjistili, že kouření se jako rizikový faktor uplatňuje pouze u anti-CCP pozitivních pacientů. Konečně pak shledali, že tabakismus vede k urychlené a zvýšené citrulinaci v buňkách plicních alveolů a zvyšuje nabídku antigenu organismu [92]. Nestandardní aminokyselina citrulin není za fyziologických okolností v peptidech přítomna a vzniká ve stárnoucích buňkách posttranslační modifikací (deiminací argininu) proteinu katalytickým působením enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD). Citrulinace navíc až 100-násobně zvyšuje afinitu vazby mezi modifikovanými citrulinovanými peptidy a některými molekulami nesoucími SE a může tak zvyšovat jejich imunopatogenicitu [94].

Symmons et al. řadí mezi rizikové faktory vzniku RA obezitu [95]. Protikladné závěry přinesly studie socioekonomického a profesního vlivu na vznik a průběh choroby. Vyšší výskyt RA byl zaznamenán u kameníků, dělníků v rybářském průmyslu a pracovníků manipulujících s organickými rozpouštědly [96].

Signifikantní podíl (40-50 %) genetické predispozice připadá na HLA komplex. Onemocnění se značně častěji vyskytuje u osob nesoucích haplotyp HLA třídy II.: DRB1*0404, DRB1*0401, DRB*0101. Uvedené alely kódující beta řetězce HLA DR molekul sdílejí společný epitop (SE) - vysoce konzervovaný úsek krátké sekvence aminokyselin, který je významným faktorem v imunopatogenezi RA [27]. Průběh choroby však determinují pravděpodobně i polymorfizmy v genu pro $\text{TNF}\alpha$ a polymorfizmy podjednotek receptorů pro Fc fragment IgG [97]. Přehled genetických aspektů RA podávám v předchozí kapitole. Terčem imunopatologické reaktivity je především synoviální membrána, která je hyperplastická, hypervaskularizovaná a infiltrovaná zánětlivými buňkami, zejména CD4^+ pomocnými T-lymfocyty [98]. Autoantigen zůstává neidentifikován, uvažuje se o roli infekce (viz výše). Nalézána je autoreaktivita namířená proti vlastním IgG molekulám, kolagenu II. typu a proteinům tepelného šoku (Hsp). Důležitou úlohu v rozvoji onemocnění hrají pravděpodobně molekulové mimikry. Nalezena byla např. sekvenční podobnost v glykoproteinu EB viru o m.h. 100 000 kDa. U nemocných se sérologicky prokázanými protilátkami proti EB viróze se rovněž nacházejí protilátky reagující s imunodominantním úsekem beta řetězce molekul HLA DR. Podobné mimikry byly prokázány pro nukleární antigen viru EN (EBNA-1) a kolagenem I. typu. Sekvenční homologie byly zaznamenány i pro hemolysin bakterie *Proteus mirabilis* [99].

Široce studovaná je otázka podílu stresových proteinů Hsp v etiopatogenezi RA. Hsp jsou buňkami vytvářeny jako reakce na metabolickou či toxickou deprivaci, mechanickou iritaci, či působení infekčního agens. U RA pacientů se ve zvýšené míře nalézají protilátky proti stresovým proteinům o m. h. 60 000 a 65 000 (Hsp 60 a 65). Zatímco Hsp 60 jsou hyperexprimovány v synovii nemocných, Hsp 65 reprezentují skupinu stresových proteinů značně rozšířených ve světě mikrobů. Kaufmann udává, že lidské a mykobakteriální (*Mycobacterium tuberculosis*) Hsp vykazují 65% sekvenční homologii [100]. Podle jedné z možných hypotéz pak mezi Hsp 60 a mikrobiálními stresovými proteiny Hsp 65 mohou existovat významné molekulární mimikry.

V patogenezi se rozlišují tři fáze onemocnění. Iničiační fáze je zprostředkována buněčnými i humorálními faktory přirozené imunity, v synovii dochází k tvorbě prozánětlivých cytokinů. Příčinou jsou nespecifické procesy aktivující lokální dendritické buňky a zapříčiňující jejich diferenciaci a migraci do regionálních lymfatických uzlin. V druhé

fázi, v lymfatických uzlinách, prezentují dendritické buňky zpracované autoantigeny T-lymfocytům. Aktivované T-lymfocyty pak míří do kloubů, kde se dále diferencují a spolu s B-lymfocyty, aktivovanými makrofágy, autoprotilátkami a komplementem, vytvářejí zánět [101]. Třetí fázi charakterizuje chronická zánětlivá reakce typická zapojením dalších buněčných elementů (fibroblasty, endotelové buňky), jejichž působením dochází k neovaskularizaci. Vedle prozánětlivých cytokinů přispívají k destrukci kloubu též polymorfonukleární leukocyty shromážděné v kloubním prostoru díky působení chemokinů. Poškození dovršují proteolytické enzymy MMP (matrixové metalproteinázy) produkované všemi buňkami zánětu a toxické zplodiny dusíkového a kyslíkového metabolismu fagocytujících buněk.

Významná patogenetická úloha v rozvoji RA připadá HLA glykoproteinům. Hlavní biologická úloha HLA molekul spočívá v prezentaci peptidových fragmentů, pocházejících z bílkovinných antigenů endo či exogenního původu, T-lymfocytům. T-lymfocyty identifikují peptid pomocí TCR receptoru složeného ze dvou řetězců (alfa a beta) a rozvinou imunitní odpověď serií interakcí s dalšími buňkami imunitního systému [102]. Některé antigeny působí jako tzv. superantigeny, váží se na zevní stranu HLA II. glykoproteinů a beta řetězec TCR, současně aktivují buňky prezentující antigen a T-lymfocyty, což resultuje v nadměrnou syntézu cytokinů a rozvoj nepřiměřené odpovědi. Proliferace a aktivita T-buněk ústí v produkci prozánětlivých cytokinů IL-2, INF- γ , GM-CSF, které zprostředkují autoimunitní reakci (reakci typu oddálené přecitlivělosti) [103]. Dochází k infiltraci postiženého ložiska lymfocyty, makrofágy a neutrofily. Migraci zmíněných leukocytů posilují chemoreaktanty IL-8, adhezi a aktivaci dvojice LFA-1 na T-buňkách a ICAM na endotelích, případně dvojice LFA-3/CD2 či VCAM-1/VLA-4. V iniciační fázi se v synovii hromadí Th1-lymfocyty (CD4⁺ paměťové buňky), které produkují prozánětlivé cytokiny, aktivují monocyty/makrofágy, podporují uvolňování monokinů a současně aktivují B-buňky, které produkují v postiženém kloubu protilátky. Charakteristická je nerovnováha v počtu Th1/Th2 buněk, převaha Th1-lymfocytů resultuje v nedostatek protizánětlivých cytokinů. Ten, spolu s aktivací monocyto-makrofágového systému, přispívá k nekontrolovanému rozvoji zánětu. Účinky významných prozánětlivých cytokinů: TNF α , INF- γ , IL-1, IL-6 či IL-17 mohou vysvětlit řadu patologických reakcí. TNF α je významný cytokin, který je klíčovým regulátorem produkce ostatních cytokinů a spolu s nimi zodpovídá za rozvoj lokálního i celkového zánětu [104]. Přítomností makrofágů je dán předpoklad k iniciaci a udržení imunitní

odpovědi. Makrofágy prezentují patognomický antigen prostřednictvím svých MHC glykoproteidů druhé třídy (MHC gp II.), současně také produkují prozánětlivé chemokiny a cytokiny. B-lymfocyty vyrábějí v synoviální tkáni autoprotilátky, které po vazbě se svými autoantigeny tvoří imunokomplexy. Imunokomplexy indukují zánětlivý proces, na němž se podílejí neutrofily tvorbou proteolytických enzymů (metalproteináz-kolagenázy a stromelyzinu, elastázy, katalapsinu B a G, želatinázy) a reaktivních O a N radikálů. Migraci neutrofilů do synovie podporuje pro RA typická neovaskularizace. Poškození chrupavky, kosti a periartikulárních struktur je zapříčiněno invazí granulační tkáně (pannu) a syntézou proteolytických enzymů, které jsou uvolňovány v reakci na přítomnost Il-1 a TNF α . Za celkové pojevy: horečku, nechutenství, malátnost, zodpovídá systémové působení cytokinů (TNF α , IL-1). Interleukin-6, Interleukin-1 a TNF α indukují syntézu proteinů akutní fáze v játrech; jedním z důsledků je zvýšená sedimentace erytrocytů. Vaskulitida je způsobena ukládáním imunokomplexů do stěny cév [2].

Prozatím nejasnou roli v indukci a udržování zánětu hrají autoprotilátky produkované především v synoviální membráně. Vazba autoprotilátek s autoantigeny vytváří imunokomplexy, které přispívají k rozvoji zánětlivého procesu. Firenstein et al. přesto uvádějí, že úloha většiny autoprotilátek v patogenezi onemocnění není podstatná [28]. K autoprotilátkám nalézaným u RA patří: revmatoidní faktory (RF), protilátky proti citrulinovaným peptidům (ACPA: anti-CCP, anti-Sa, anti-MCV), antiperinukleární faktory (APF), antikeratinové protilátky (AKA), heterogenní nukleární ribonukleoprotein (hnRPN) a anti nukleární protilátky – protilátky proti histonům.

2.3.5 Klinický obraz

Symptomatika onemocnění je variabilní, jednoznačný obraz vyličit nelze. Nemoc probíhá chronicky progresivně, v atakách a remisích. Rozvíjí se až 2x častěji v zimních měsících, k exacerbacím pak dochází zvláště na jaře (březen, duben). Vencovský podává vzhledem k průběhu choroby následující klasifikaci :

Monocyklický typ: jeden cyklus onemocnění je následován remisí trvající nejméně jeden rok, týká se méně než 20 % pacientů.

Polycyklický typ: nejběžnější, pozorovaný u 70 % nemocných. Charakterizován pozvolnou progresí s epizodami remisí, různě dlouho trvajících, většinou nekompletních.

Progresivní typ: trvale progredující, bez remisí, včetně tzv. maligní formy, která je typická nelítostným průběhem s rychlým vývojem destrukcí [18].

Spektrum příznaků je široké a sahá od lehké synovitidy s krátkodobou ranní ztuhlostí v případě mírné formy, po těžkou, imobilizující artritidu, s rychlou destrukcí kloubů a závažným mimokloubním postižením. Nutno rozlišovat časné stádium (nástup a časný rozvoj) a obraz vyvinuté chronické nemoci. Klinický obraz v obou fázích nemoci může jevit variace a atypie.

Počátek bývá plíživý (50 % - 70 % případů), méně často akutní (15 %), či subakutní (20 %), mohou mu předcházet precipitující faktory: trauma, infekce, vakcinace, emocionální stres. Časté bývají prodromální symptomy: subfebrilie, únava, nechutenství a úbytek hmotnosti.

Nemoc postupuje obvykle centripetálně. V popředí je polyartritida symetricky postihující především metakarpofalangeální (ulnární deviace) a proximální interfalangeální klouby (vřetenovitý tvar prstů), zápěstí - radiokarpální klouby, nebo odpovídající klouby dolních končetin. Později jsou zasaženy i klouby kolenní, loketní, hlezenní a metatarzofalangeální. Kyčelní klouby jsou poškozovány v 20 % případů. Vzácnější je postižení mandibulárních, kostovertebrálních a metatarzofalangeálních kloubů palce. Charakteristický je vznik deformací a deformit postižených struktur. Závažné jsou afekce krční páteře. Patologický proces se lokalizuje do oblasti horní C-páteře, napadá apofyzární klouby a okolní struktury, zejména ligamentózní aparát. V pokročilých stádiích dochází k luxaci obratlových těl, přičemž nejzávažnější je život ohrožující atlanto-axiální dislokace.

Mimokloubní komplikace postihují nejčastěji:

- **Srdce** (perikarditis až v 50 %);
- **cévy** (vaskulitis, Raynaudův sy.);
- **oči** (skleritis);
- **periferní nervy** (tunelové sy.);
- **ledviny** (glomerulopatie);
- **játra** (i bez závislosti na terapii);
- **pohybový systém** (revmatické uzly nad extenzory a v okolí loktů, myopatie, svalová atrofie, tendinitidy, burzitidy, entezopatie, osteoporóza);
- **krev** (anémie).



Obr. 3: RA, těžké deformity rukou



Obr. 4: RA, těžké deformity nohou

Diagnosticky cenným kritériem je subjektivně pociťovaná ranní ztuhlost s bolestí, která se během dne mírní. V pokročilejších stádiích a při zvýšené aktivitě nemoci bývá bolest spontánní, klidová a výrazná.

2.3.6 Psychosomatické aspekty

Psychičtí činitelé zastávají v etiopatogenezi RA výraznou úlohu. Psychosomatické výzkumy poskytly cenné informace významně doplňující obraz choroby. Přestože lze psychické faktory rozdělit na konstituční a akcidenční, je reálně obtížné vzájemně je odlišit. U většiny psychosomaticky nemocných bývají diagnostikovány závažné strukturální poruchy osobnosti, jejichž vznik se váže k raným vývojovým stádiím ve vztahu matka – dítě.

Vzhledem k RA jsou uváděny následující skutečnosti:

1. Je prokázáno, že emočně zatěžující situace ovlivňují etiopatogenezi i průběh nemoci.
2. Psychofyzilogické experimenty potvrdily výskyt abnormálně zvýšeného svalového napětí ve vzrušivých a zátěžových situacích, významně dlouho přetrvávající i po odeznění stimulu. Revmatoidní artritik odvádí své konflikty a agresivní pocity automaticky na svalové dráhy. Zejména angličtí autoři zdůrazňují tendence nemocných vyjádřit potlačená agresivní hnutí muskulaturou kosterního svalstva. Obtíže při zacházení s vlastními agresivně nepřátelskými impulsy ústí v kombinaci nadměrné sebekontroly a manipulace druhými.
3. Přestože osobnostní obraz postižených není zdaleka jednotný, bývá konstatována převaha tří charakterových rysů :

- a. Nutkavý rys s přehnanou svědomitostí, perfekcionismem a vnějškovou poddajností, který je svázán s tendencí potlačit všechny nepřátelské impulsy jako hněv a zlobu.
- b. Masochisticko-depresivní rys, projevující se silnou potřebou po sebeobětování, přepjatou touhou pomáhat, vázanou s nadměrně morálním chováním a tendencí k depresivním rozladám.
- c. Premorbidně silná potřeba tělesné aktivity (výkonové sporty, intenzivní práce v domácnosti atd.).

Působivá je zvláštní, nepochopitelná, neměnná, vždy přítomná trpělivost pacientů v rozvinuté fázi onemocnění. Na první pohled jsou trpělivi, ohleduplní, nenároční, skromní, vlastně ale indolentní.

Výše uvedené vlastnosti jsou překompenzované obranné prostředky proti základnímu konfliktu. Z psychodynamického hlediska se jedná o charakterově neurotická přepracování konfliktů v agresivní oblasti a v touze po uplatnění [105].

2.3.7 Terapie RA

Léčba RA by měla být komplexní a multidisciplinární. V ideálním případě zahrnuje kromě medikamentózního či chirurgického ošetření i režimová opatření (prevence kontraktur), fyzikální terapii a rehabilitaci, případně psychoterapii. Kauzální léčba neexistuje, terapie je zaměřena na zmírnění symptomů a zpomalení rozvoje choroby.

Jako lék první volby se nejčastěji užívají nesteroidní antirevmatika spolu s analgetiky pro jejich protizánětlivý, protibolestivý, antipyretický a dekontrakční účinek. V prvních pěti letech nemoci se uplatňuje důsledná léčba DMARDs – tzn. farmaky modifikujícími průběh choroby. Patří sem široké spektrum léčiv: antimalarika, soli zlata, sulfasalazin, penicilamin, metotrexát, cyklofosfamid, leflunomid a v širším smyslu též extrémně nákladná biologická léčba. Biologické léky jsou geneticky připravené proteiny zaměřené proti cytokinům (TNF α , IL-1, IL-6). Nejčastěji indikovanými a v ČR již registrovanými preparáty jsou etanercept, infliximab, anakinra, adalimumab, či rituximab. V rámci klinických studií se v RÚ testují i další nové molekuly. Pro vysokou účinnost, ale i množství nežádoucích účinků (zvýšený výskyt infekcí, především TBC a některých maligních onemocnění), je biologická léčba rezervována pro vysoce aktivní a refrakterní

případy. Systémově – dlouhodobě a v malých dávkách se podávají kortikosteroidy, depotní formy se infiltrují do nejvíce postižených kloubů.

Četné studie zkoumaly otázku farmakoterapeutického vlivu na hladiny autoprotilátek, asociovaných s RA. Bobbio-Pallavicini et al. sledovali autoprotilátkové profily během dlouhodobé (78 týdnů) kombinované léčby infliximabem a metotrexátem. Ačkoli léčba vedla k výraznému snížení skóre aktivity onemocnění (DAS), nebyl zaznamenán vliv na dlouhodobý pokles hladin anti-CCP protilátek. RF IgM protilátky však byly výrazně sníženy [106]. Podobné závěry vyplývají i z dalších výzkumů [107,108,109,110,111]. Tak Nissinen et al. nezaznamenali v průběhu šestitýdenního sledování změnu anti-CCP hladin, přestože 60 % pacientů vykazalo významnou klinickou odpověď. Hodnoty IgM-RF poklesly během prvních týdnů léčby [107]. Caramaschi et al. [110], De Rycke et al. [109] a Kolarz et al. [111] rovněž pozorovali snížení pouze RF IgM hladin po terapii infliximabem. Malý, ale signifikantní pokles anti-CCP protilátek ve 24. týdnu léčby u pacientů s klinickým zlepšením zaznamenali Alessandri et al. [108]. Tento jev platící též pro RF IgM způsobila medikace infliximabu, protože snížení anti-CCP hladiny po podávání samotného metotrexátu nebylo zaznamenáno. Pokles anti-CCP protilátek po léčbě adalimumabem [112], etanerceptem [113] a infliximabem [108] zaznamenalo několik studií. Je možné, že DMARDs medikace může u cca. 50 % pacientů vést k významné redukci (> 25 %) hladin anti-CCP i IgM RF protilátek. Dle Mikulase et al. koreluje efektivní léčba DMARDs se snížením RF IgM [114]. Ve studii Ronnelida et al. vedla monoterapie sulfasalazinem k poklesu anti-CCP protilátek v prvním roce léčby, ten však nekoreloval s klinickými ukazateli [115]. Vencovský konstatuje, že pokles anti-CCP hodnot spojený s farmakoterapií představuje spornou otázku a rozhodně není jednoznačný [116].

2.4 Laboratorní diagnostika

2.4.1 Obecná charakteristika autoprotilátek

Autoprotilátky jsou imunoglobuliny, jejichž specifita je namířena proti endogenním antigenům: proteinům, glykoproteinům, nukleovým kyselinám, fosfolipidům a glykofosfolipidům. Patogenní autoprotilátky svou činností poškozují buňky či tkáň vlastního organismu a jejich přítomnost je charakteristickým rysem autoimunitních onemocnění. S ohledem na indukci, efekt, specifitu a klinický význam, představují

značně heterogenní skupinu protilátek. Nejobecněji je lze klasifikovat na tzv. přirozené (fyziologické) a patogenní. Přirozené autoprottilátky hrají v organismu fyziologickou úlohu a jejich produkce nevede ke vzniku onemocnění. Obvykle jsou polyspecifické, izotypu IgM, s nízkou afinitou k antigenům a nalézány v nižších titrech. Jejich tvorba probíhá bez indukce. Patoenní autoprottilátky bývají izotypu IgG, vznikají na podkladě imunitní odpovědi namířené proti vyvolávajícímu antigenu, nebo jako defektní regulace lymfocytů: pravděpodobně však kombinací obou dějů. Mechanismů, za jejichž účasti jsou autoprottilátky produkovány je popsána řada, stejně tak způsobů, kterými bývá vyvoláno tkáňové poškození.

Velmi užívané je dělení autoprottilátek na orgánově-specifické, tzn. reagující pouze se strukturami určitého orgánu a orgánově-nespecifické, s afinitou k nespecifickému součástí buněk či extracelulárním složkám, bez ohledu na orgán, ze kterého pocházejí.

Vyšetření autoprottilátek slouží jako marker autoimunitních onemocnění, jejich určení je cenné diagnosticky i prognosticky. Nález může klinickou manifestaci choroby předcházet, provázet manifestní onemocnění, s onemocněním se však pojit nemusí. Řada autoprottilátek, které jsou indukovány specificky u autoimunitních onemocnění, má významnou klinickou relevanci, bez ohledu na svou úlohu v patogenezi onemocnění [117]. U nemocných můžeme zaznamenat přítomnost jediné autoprottilátky, často však i několika současně. Průkaz bývá podáván ze séra, ale i dalších tělesných tekutin (synoviální tekutina, liquor).

2.4.2 Diferenciální laboratorní diagnostika RA

Včasná diagnóza a vhodně zvolená terapie významně ovlivňují prognózu RA. Hlavní diagnostické pilíře tvoří u revmatických onemocnění anamnéza, klinický nález (včetně výsledků zobrazovacích metod) a sérologické laboratorní testy [118]. Diagnostika RA je tak kromě anamnézy, klinického a paraklinického vyšetření založena na vyšetření krve, případně synoviální tekutiny. Důležité, avšak nespecifické laboratorní parametry představují c-reaktivní protein (CRP), sedimentace erytrocytů (FW) a přítomnost revmatoidního faktoru (RF). První dva ukazatele jsou významnými indikátory zánětu.

Typickým laboratorním vzorcem aktivní nemoci je zvýšená až velmi vysoká sedimentace erytrocytů (FW), elevovaný až vysoký titr CRP, trombocytóza, anémie,

pozitivita RF (jen asi u 80 % pacientů, negativita RF nevylučuje RA, ale i naopak, samotná přítomnost RF nezakládá diagnózu RA). FW většinou koreluje s aktivitou onemocnění. Ve vzácných případech mají někteří pacienti sedimentaci stabilně normální, či jen lehce hypernormní. V krevním obraze se vyskytuje normochromní či hypochromní anemie, trombocytóza, v akutní fázi i leukocytóza. Z reaktantů akutní fáze se nejčastěji určuje CRP – C reaktivní protein, nejdůležitější ukazatel aktivity zánětu. Koncentrace CRP v synoviální tekutině i plazmě bývá výrazně zvýšena. Elektroforéza sérových bílkovin ukazuje elevaci gama globulinů, v případě akutní exacerbace i alfa 2 globulinů. V imunoэлектроforéze mohou být zvýšeny všechny třídy imunoglobulinů, typicky v izotypu IgG. Hladina cirkulujících imunokomplexů bývá v aktivní fázi nemoci elevovaná. Kloubní výpotek je sterilní se zmnoženými polynukleáry a mononukleáry (tisíce až desetitisíce buněk v cm³). Uvedené parametry mohou v průběhu nemoci, ale i v odezvě na terapii kolísat.

Úkolem diferenciální laboratorní diagnostiky je odlišení RA od ostatních druhů artritid (asymetrická oligoarthritis), některých chorob infekční etiologie (hepatitida B a C, sarkoidóza, lymfská borelióza), případně i ostatních systémových autoimunitních onemocnění. Dokonalé rozlišení zmíněných diagnóz však bývá komplikované a v určité fázi choroby i nemožné.

Velmi důležitým diferenciálně diagnostickým kriteriem jsou hladiny autoprotilátek. Jako obecná screeningová metoda pro systémová onemocnění pojiva slouží test na antinukleární protilátky (ANA) [119]. ANA reprezentují autoprotilátky proti orgánově nespecifickým buněčným antigenům, zahrnují protilátky proti antigenům jádra (DNA, RNA, histony, nukleoproteiny) a cytoplazmy (mitochondrie, skelet. mikrozomy, lysozomy, peroxizomy, Golgiho aparát). Jejich identifikace je důležitou součástí klinické imunologie. Vyskytují se již před propuknutím a v prodromální fázi choroby, pozitivní výsledky však dávají též vyšetření zdravých starších lidí, těhotných žen, pacientů s nádorovým onemocněním, chronickou infekcí a mnoha dalšími chorobami. Přes důležitost informace musí být ANA interpretována v kontextu klinických dat. První metodou volby bývá mikroskopické vyšetření nepřímou imunofluorescencí, kde jako substrát slouží vrstva lidských nádorových buněk – HEp-2 karcinomu laryngu. Podle způsobu reakce autoprotilátek s buněčnými komponentami lze zaznamenat odlišné typy fluorescenčních obrazů [117]. Většina obrazů neurčí jednoznačně některou z autoprotilátek, může však pomoci při dalším

vyšetřování. Fluorescenční obraz je klasifikován do šesti hlavních typů, případně dalších subtypů. Interpretace výsledku tak závisí na druhu imunofluorescenčního obrazu, diagnosticky významné jsou výsledky silně pozitivní a negativní. U hraničních a slabě pozitivních testů je třeba v konečné interpretaci zohlednit uvedený typ imunofluorescence. K přesnější identifikaci ANA jsou určeny další metody, např. komerčně dostupné ELISA testy, při nichž se užívají celá jádra, jaderné extrakty nebo směsi purifikovaných či rekombinantních jaderných proteinů. Blotovací metody pak využívají jak přirozené, tak rekombinantní antigeny.

Revmatoidní faktor (RF) reprezentuje protilátky proti imunoglobulinům (Fc fragment), pozitivitu vykazuje asi 70 – 80 % pacientů s RA. Zvýšené hladiny RF bývají nalézány u chronických infekcí různé etiologie, jiných autoimunitních chorob (Sjögrenův syndrom, SLE, bakteriální endokarditida), ale též až u 15 % zdravých jedinců [120]. Jeho fyziologická hladina stoupá s věkem. RF se nemusí vyskytovat v prodromální fázi, objevit se může až v průběhu onemocnění. Ke screeningovému vyšetření se používají metody založené na principu aglutinace, turbidimetrie, či nefelometrie. Tyto metody jsou semikvantitativní a detekují především RF třídy IgM. Detekce RF v jednotlivých třídách IgA, IgG a IgM pomocí ELISA metod umožňuje kvantitativní stanovení s vysokou citlivostí. Hladina protilátek a zastoupení jednotlivých tříd RF v séru pacienta závisí na klinických parametrech a aktivitě onemocnění. Je prokázána korelace mezi výší hladiny RF IgA, IgG a prognózou onemocnění. Vzhledem ke skutečnosti, že RF mohou být detekovány i u zdravých jedinců (5 %, ve stáří až 20 %) a pacientů s jinými autoimunitními onemocněními a chorobami infekčního původu, směřoval vývoj sérologické diagnostiky RA k hledání vhodnějšího markeru, který by byl pro nemoc vysoce specifický a přitom dostatečně senzitivní.

Na počátku 21. století tak byl do rutinní diagnostiky zaveden další a pro RA specifitější ukazatel – průkaz anti-CCP, tj. protilátek proti cyklickému citrulinovanému peptidu. Jejich přítomnost je z 96 – 98 % pro nemoc specifická, tzn., že pacient s pozitivitou anti-CCP protilátek, trpí v 96 - 98 % RA [121]. Podobně jako RF, ani anti-CCP nejsou přítomny u všech nemocných. Sledování přítomnosti hladin anti-CCP protilátek odlišuje na základě positivity či negativity dvě různé formy onemocnění. Horní hranice senzitivity třetí generace testů byla v případě etablované RA některými výrobci udávána až k hranici 80 %. Anti-CCP protilátky se objevují již v brzkých stádiích nemoci, což je velmi významné

vzhledem k nutnosti co nejrychlejšího zahájení léčby. Průkaz anti-CCP protilátek má význam diagnostický i prognostický. Přítomnost a množství autoprotilátky koreluje se závažností průběhu nemoci; průkaz je asociován se závažnějšími formami s rychlejším vznikem erozí a slouží jako ukazatel vývoje choroby usnadňující volbu terapie.

Do praxe recentně zavedeným, pro nemoc vysoce specifickým a senzitivním testem je průkaz protilátky proti mutovanému cyklickému vimentinu - anti-MCV. Studie 1151 pacientů s RA zjistila, že anti-MCV mají stejnou specifitu jako anti-CCP protilátky, avšak vyšší citlivost (82 % versus 72 %) [122]. Vimentin je všudypřítomný citrulinovaný protein, který byl pozorován v revmatoidní synoviální tkáni pacientů s RA. Nedávné nálezy ukázaly, že produkce a úpravy vimentinu makrofágy jsou závislé na prozánětlivých signálech [123]. Výše hladin anti-MCV protilátek u pacientů s RA tedy silně koreluje s ukazatelem aktivity choroby dle skóre DAS [122]. Anti-MCV průkaz je důležitým kritériem farmakologické rozvahy a znamená významné zpřesnění diagnostiky a prognostických výhledů nemoci.

2.4.2.1 Autoprotilátky u RA

Existuje pouze několik autoprotilátek skutečně specifických pro RA. Nižší specifita revmatoidních faktorů stimulovala výzkum nových, potenciálně diagnosticky využitelných autoprotilátek a jejich cílových struktur. Přehled podávám v tabulce číslo 2.

Tabulka 2: Diagnosticky využitelné protilátky u RA (Upraveno dle Firenstein et al. [28]).

Autoprotilátka	Antigen	Senzitivita	Specificita
APF	Filagrin	40 %	92-99 %
AKA	deiminovaný arginin	36-59 %	70 %
Anti-Sa	vimentin	20-47 %	92-98 %
APCA/ Anti-CCP2	neznámý	82 %	92-98 %
Anti-RA33	hn RNP-A2	30 %	90 %
Anti-p68	stresový protein BiP	63-71 %	73-96 %
RF	IgG	50 %	96 %
Anti-MCV	vimentin	71 %	95 %

2.4.2.1.1 Revmatoidní faktory (RF)

RF jsou autoprotilátky reagující s Fc částí molekuly IgG. Ačkoli byly objeveny před téměř 70 lety, je RF průkaz stále platným sérologickým markerem RA. Syntéza probíhá v lymfatické tkáni zánětlivého kloubu, kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině a podkožních revmatických uzlech. IgM RF pozitivní nález vykazuje 75 - 80 % nemocných RA (tzv séropozitivní RA), 15 - 20 % pacientů je séronegativních. Senzitivita průkazu je tedy vysoká, jeho specificita podstatně nižší. Zvýšené titry lze nalézt i u zdravé populace. Trvale zvýšené hladiny mívají nositelé chronických bakteriálních infekcí (TBC, syfilis, lepra, subakutní bakteriální endokarditida), přechodně elevované pacienti s virovým infektem a po vakcinaci. V různém procentu doprovází RF pozitivita řadu dalších chorob (SS, hepatitis C). U osob starších šedesáti let fyziologická hladina RF stoupá. Séropozitivní RA pacienti mají horší prognózu než pacienti séronegativní.

Stanovení přítomnosti RF lze provést z různých tekutin – rutinně ze séra či kloubního punktátu. Vedle IgM existují i IgG, IgA, IgD, IgE izotypy RF. Nejužívanější detekční metodou je aglutinační, latex-fixační test prokazující IgM RF. Výsledky jsou vyjádřeny jako poslední titr ředění séra, za pozitivní se považuje titr vyšší než 1:80 [2].

Metoda ELISA dovoluje stanovit všechny třídy RF (IgM, IgA, IgG, IgE), pro IgM RF je navíc senzitivnější než testy aglutinační. RF IgM, IgG a IgA mohou být přítomny jednotlivě i současně, v závislosti na klinických parametrech a aktivitě onemocnění. Přínos vyšetření v různých třídách imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) lze shrnout do tří bodů:

1. Průkaz RF u séronegativní RA (detekce skrytých RF). Vencovský udává výskyt 15 % IgM RF (atypický, neaglutinující IgM RF) a 20 % v dalších izotypech Ig u RF negativních nemocných [124].
2. Hodnota IgG RF koreluje lépe než hodnota IgM RF s aktivitou RA a je dávana do souvislosti s výskytem sekundární vaskulitidy a horší prognózou onemocnění.
3. Pozitivita IgA RF signalizuje vážnější výskyt erozivního kloubního postižení v průběhu RA.

RF lze stanovit i nefelometricky.

Imunitní role RF

Za normálních okolností hrají v imunitním systému RF fyziologickou úlohu. IgM a IgG RF se mohou pojit s imunitními komplexy (IK) a napomáhat jejich likvidaci vazbou na Fc receptory fagocytujících buněk. Významná je afinita na IK obsahující IgG2 a IgG4, které hůře váží a aktivují komplement. B-buňky mohou za pomoci membránově vázaného Ig antigen zachytit a prezentovat. Membránově vázané RF mohou zachytit IK s IgG, prezentovat antigenní i protilátkové součásti imunitních komplexů T-lymfocytům a stimulovat tak imunitní odpověď. V séru cirkulující RF nemají významný patogenní efekt, negativní úlohu však může plnit lokální tvorba kvalitativně odlišných RF, které přispívají k indukci a udržování kloubního zánětu. Imunokomplexy obsahující RF mohou vést k fixaci komplementu a aktivaci komplementové kaskády v sousedních tkáních. Stejným mechanismem pak dochází k chemotaxi makrofágů, lymfocytů a neutrofilů do kloubní dutiny. Zde se uplatňují RF v izotypu IgG, které mohou formovat tzv. vzájemně spojené IK se značnou patogenicitou, zejména v synovii. Rozdíl mezi chorobnou a fyziologickou produkcí RF je dán výší hladiny vyráběných protilátek, perzistencí vysokých RF titrů a přeměně IgM do IgA a IgG izotypů u nemocných. U zdravých jedinců dochází po imunizačním stimulu k potlačení sekrece, přeměně do patogenních RF tříd je zabráněno mechanismem kompetitivní tolerance, když je málo početným RF B-buňkám znemožněna stimulace prekurzorových přirozených B-lymfocytů s následnou expanzí patologických klonů.

Genetické aspekty

Genetická dispozice k sekreci revmatoidních faktorů je nepochybná. Literatura uvádí 15 - 30 % konkordanci u monozygotních dvojčat a zvýšený rodinný výskyt. V pohledu na vztah mezi zvýšenou produkcí RF a nosičstvím alel HLA-DRB1 SE se však údaje liší. Vencovský konstatuje, že elevovaná hladina RF je asociována se zvýšenou frekvencí výskytu HLA-DR4 alel, jak u RA nemocných, tak u jejich zdravých příbuzných. K podobným závěrům došli Matthey et al. [125], ale i další, když potvrdili, že přítomnost RF je ve vazbě na SE. Tento fakt však některé studie neprokázaly a vztah mezi nosičstvím HLA-DRB1*04, respektive alelami kódujícími SE považují za slabý, nekonstantní, nebo jej nezjistily vůbec. Za primární pak považují asociaci SE s tvorbou anti-CCP protilátek [36].

Protože zvýšenou sekreci RF nelze vysvětlit pouze účastí HLA genů, jsou zkoumány i další lokusy. Za kandidáty dědičnosti v tvorbě RF jsou považovány geny kódující variabilní oblast imunoglobulinové molekuly a geny vytvářející buněčný receptor T-lymfocytů.

2.4.2.1.2 Protilátky proti citrulinovaným peptidům (ACPA), anti-CCP protilátky

Významný pokrok přesahující obor revmatologie znamenal v 90. letech minulého století objev citrulinace peptidů. Již v šedesátých letech 20. stol. byly popsány antiperinukleární faktory (APF), koncem let sedmdesátých pak antikeratinové protilátky (AKA) pro RA značně specifické. Až v roce 1993 byl identifikován oběma autoprotiátkám společný antigen – lidský epidermální protein filagrin. Následnými výzkumy pak Schellekens a spol. prokázali, že APF/AKA anti-filagrinové protilátky rozpoznávají epitopy, obsahující nestandartní aminokyselinu citrulin [126].

ACPA představuje souhrnné označení pro protilátky proti citrulinovaným proteinům, které jsou nejčastěji prokazovány jako anti-CCP (cyklický citrulinovaný peptid) protilátky. Anti-CCP je imunitní protein namířený proti kruhovému peptidu obsahujícímu nestandartní aminokyselinu citrulin, která za fyziologických okolností není v peptidech a proteinech přítomna. Citrulin vzniká ve stárnoucích buňkách posttranslační modifikací (deiminací argininu) proteinu pomocí enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD) a za zvýšené koncentrace kalciových iontů. Biochemickým výsledkem tohoto procesu je

konverze pozitivně nabitých argininů do polárních, ale nenabitých citrulinů. Tyto změny v proteinu jsou zodpovědné za jeho nově získanou antigenicitu [127]. Deiminace argininu na citrulin tedy mění imunologické vlastnosti proteinu (nejen filagrinu), který se stává antigenním. Citrulinace proteinů není specifická pouze pro RA, byla prokázána u řady nemocí (SLE, Sjögrenův sy., chronická hepatitida) a představuje fenomen provázející zánět. Od výše uvedených chorob se RA odlišuje schopností vytvářet proti citrulinovaným antigenům autoprotilátky, které jsou pro nemoc vysoce specifické a jejichž průkaz se stal cenným diagnostickým, ale i prognostickým kritériem choroby.

K detekci autoprotilátek sloužil původně test s cyklickým citrulinovaným peptidem derivovaným od filagrinu (anti-CCP1), později byla vyvinuta dokonalejší forma se selektivně vybranými, nepřírozeně se vyskytujícími cyklickými citrulinovanými peptidy (anti-CCP 2). Vývoj dále pokračuje a někteří výrobci označují své výrobky jako třetí generaci testu (anti-CCP3). Obecně udávaná specifita tak v současnosti činí 94 %, senzitivita pak 61 % u časně RA a 75 % u rozvinuté formy onemocnění [128]. Určení je prováděno ze séra, případně synoviální tekutiny. Skutečný cíl anti-citrulinové autoimunitní odpovědi zůstává prozatím neznámý, kandidáty na antigeny podílející se na indukci nemoci jsou zejména citrulinované proteiny nalézané v revmatoidní synovii: fibrin, vimentin, citrulinovaný kolagen typu II., citrulinovaná forma alfa-eneolasy a virový citrulinovaný peptid EBNA-1.

Anti-CCP protilátky mohou být zjišťovány premorbidně, v časných fázích onemocnění pak nález pomáhá diferencovat RA od jiných typů artritid. Přítomnost a množství autoprotilátky koreluje se závažností průběhu nemoci; průkaz je asociován se závažnějšími formami s rychlejším vznikem erozí a slouží jako prognostický ukazatel vývoje choroby usnadňující volbu terapie [129,130]. Některé studie podaly zprávu o snížení hladiny anti-CCP protilátek po užití biologické léčby a asociaci s klinickým zlepšením [108]. Oproti RF se anti-CCP neobjevují během stárnutí a představují významnou diagnostickou pomoc u pacientů vyššího věku. Studie několika posledních let přinesly zjištění, že anti-CCP test rozlišuje dva patogeneticky odlišné typy onemocnění, anti-CCP pozitivní a anti-CCP negativní RA. Kromě různého genetického pozadí je anti-CCP+ forma citlivá k expozici tabákovým kouřem a vykazuje vyšší míru lokálních kloubních destrukcí v důsledku vyššího počtu infiltrujících lymfocytů [131].

Genetické aspekty

Byla prokázána silná vazba (okolo 60 %) mezi přítomností anti-CCP a sdíleným epitopem (SE). Tzv. sdílený epitop (SE), nalézající se na některých HLA-DRB1 molekulách (HLA-DRB1* 0401, 0404, 0405, 0408, 0409, 04010 (HLA-DR 4), HLA-DRB1*0101, 0102 (HLA-DR1), HLA- DRB1* 1001 (HLA-DR 10), HLA-DRB1* 1402) a reprezentující sekvenční motiv pěti aminokyselin (QRRAA, RRRAA, QKRAA) na pozicích 70 - 74 ve třetí hypervariabilní oblasti DRB1(beta řetězec) molekuly, byl shledán jako rizikový faktor vzniku anti-CCP protilátek u nemocných s časnou nediferencovanou artritidou, u nichž se posléze vyvinula RA. Van Gaalen et al. prokázali, že pozitivita pro sdílený epitop je v silné vazbě se zvýšenými hladinami anti-CCP protilátek [35]. Tento fakt potvrdili Irigoyen et al. [36], když na souboru více jak 1700 RA pacientů shledali silnou asociaci mezi SE a anti-CCP, nezávislou na pozitivitě RF. Naopak, u RF zjistili pouze slabou vazbu s SE, nezávislou na anti-CCP. Dvě další studie potvrdily, že SE je asociován pouze s vývojem anti-CCP pozitivní artritidy, u anti-CCP negativních pacientů vazba prokázána nebyla [92,132]. Bizzaro et al. k tomu poznamenávají, že vysoké hladiny anti-CCP mohou být nalézány i u některých pacientů s nepřítomností SE [133]. Ding et. al. však došli k závěru, že anti-CCP pozitivní pacienti představují samostatnou genetickou podskupinu v rámci RA. Analýza souborů anti-CCP+ a anti-CCP- RA ukázala nápadný rozdíl ve struktuře asociací napříč MHC. Ze studie typu případ-kontrola, s použitím panelu 2221 SNP markerů na souboru 1200 anti-CCP+ pacientů a 1700 kontrol vyplynuly silné důkazy asociace napříč širokou oblastí MHC. Studie CCP- pacientů (přes 600 případů a 600 kontrol) proti tomu nevykázala žádnou významnou MHC vazbu, což jen potvrzuje předchozí údaje o sdružení HLA-DRB1 s anti-CCP+ formou nemoci [37]. Starší práce však předpokládaly asociaci HLA DR 3 alely s rizikem vývoje anti-CCP negativní RA [134,43,36]. Tato skutečnost obrátila pozornost k vazbě RA s A1-B8-DR3 haplotypem (SE nekódující haplotyp), asociovaným s širokou škálou autoimunitních procesů a imunologických fenotypů.

Potvrzena byla též interakce mezi abusem tabáku, sdíleným epitopem a tvorbou anti-CCP [91]. Tak se riziko vývoje RA u pacientů – kuřáků s dvěma kopiemi SE zvýšilo až 21 krát. Kouření tedy vede k urychlené a zvýšené citrulinaci v buňkách plicních alveolů a zvyšuje nabídku antigenu organismu [127].

Za kandidátní geny predispozice k tvorbě ACPA jsou považovány geny pro určité formy enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD). U japonských revmatoidních artritiků byl nalezen častý SNP polymorfismus v genu pro PAD 4 související s větší produkcí enzymu a vyšší citrulinací.

2.4.2.1.3 Anti-MCV – protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu

Protilátky proti mutovanému či modifikovanému citrulinovanému vimentinu patří do rodiny ACPA, skupiny protilátek proti citrulinovaným proteinům. Jejich detekce je nedávno zavedenou součástí diagnostiky časně RA, významnou pomoc představuje zejména u RF a anti-CCP negativních pacientů (séronegativní RA). Protilátky anti-MCV dnes představují prominentní diagnostickou a prognostickou hodnotu, jsou využívány jako efektivní biomarker pro odhad průběhu revmatoidní artritidy a svým významem převyšují význam revmatoidních faktorů [122]. Hlavní výhodou testování na anti-MCV je přítomnost anti-MCV protilátky v raném stadiu onemocnění, což umožňuje detekci časně RA a indikaci adekvátní léčby těsně po propuknutí nemoci. Hladiny anti-MCV protilátek navíc vykazují silný vztah k aktivitě a závažnosti onemocnění a úspěšnosti léčby [135,136]. Test prokazující anti-MCV protilátky vyvinuli v roce 2007 Bang et al. [122].

Vimentin patří do skupiny IF proteinů, exprimuje se v buňkách a tkáních embryí a v mezenchymových buňkách a makrofázích dospělých organismů [137]. Dlouhou dobu byl považován za pouhou strukturní složku cytoskeletu, nedávné studie však odhalily jeho zapojení do mnoha důležitých buněčných procesů. Účastní se např. přenosu signálů, nitrobuněčného transportu, reakce na stres, apoptózy a regulace pohyblivosti buněk. Tyto objevy objasňují mimo jiné korelaci exprese vimentinu a růstu nádorů, jejich invazivity, metastatické aktivity a prognózy různých nádorových onemocnění [138]. V buňkách není obvykle přítomen v citrulinovaném stavu, jeho deiminace však probíhá v makrofázích podstupujících apoptózu. Mutovaný citrulinovaný vimentin se tak může vyskytnout jako důsledek nedostatečné clearance apoptotického materiálu [139]. Vimentin v citrulinované formě je tedy přítomen též v synoviální tekutině a zánětlivém pannu RA nemocných [122, 140]. Poprvé byl popsán v roce 1989 a po prvním pacientovi, na kterém byl prokázán pojmenován jako Sa [140]. Následné studie pak ukázaly, že citrulinovaný vimentin je jednou z prvních protilátek u nemoci se vyskytujících a jeho průkaz by mohl být citlivější než v případě syntetických anti-CCP [139,141]. Diagnostická hodnota anti-Sa protilátek je však navzdory jejich vysoké citlivosti snížena zejména v případech plně rozvinuté formy

onemocnění [142,143,144]. V r. 2007 Bang et al. označili vimentinovou izoformu, u níž byly argininové zbytky nahrazeny glycinem, a nazvali ji mutovaným citrulinovaným vimentinem. Vývojem protilátky proti této izoformě (anti-MCV) pak zlepšili diagnostickou přesnost ve srovnání s anti-Sa [122]. Raza et al. udávají, že u nemocných s příznaky trvajícími déle než 12 měsíců, činí specifická anti-MCV 95 %, senzitivita pak 71 % [145]. U pacientů se symptomy časně synovitisy trvajícími méně než tři měsíce udávají titíž autoři specificku 91 %, senzitivitu 54 %. Podle jiné studie vykazuje komerčně dostupný anti-MCV ELISA test přibližně stejnou senzitivitu a specificku jako průkaz anti-CCP protilátek [146].

Proti zmíněným faktům však hovoří výsledky nedávného výzkumu hodnotícího diagnostický význam anti-MCV protilátek u časně zánětlivé artritidy. Srovnání testů odlišujících RA od jiných druhů artritid ukázalo nižší specificku pro anti-MCV (82,9 %) než pro anti-CCP2 (93,4 %) a anti-CCP3 (90 %). Senzitivita anti-MCV byla mírně vyšší (62 %) než u anti-CCP2 (56,9 %), respektive anti-CCP3 (58,1 %). Celkově je diagnostická hodnota anti MCV ve srovnání s anti-CCP testy nižší [147].

Pro diagnostiku včasného zachytu RA byl v poslední době vyvinut sérologický point of care test (POCT) kombinující detekci RF s anti-MCV, který vykazuje specificku 99,7 % a senzitivitu 72 % [148,149].

2.4.2.1.4 Anti-Sa protilátky

Anti-Sa protilátky jsou protilátky proti citrulinovanému vimentinu a řadí se do skupiny protilátek proti citrulinovaným proteinům (ACPA). Vimentin je citrulinován v odumírajících makrofázích a byl popsán v synoviální tkáni nemocných [127]. Firenstein et al. uvádějí, že anti-Sa autoprottilátky byly detekovány u přibližně 40 % nemocných s RA [28]. Vencovský udává variační šíři 20 – 47 %. Anti-Sa mají pro RA vysokou specificku pohybující se mezi 92 – 98 %. Jejich průkaz má značnou prognostickou hodnotu, neboť identifikuje pacienty s agresivní a vysoce destruktivní formou onemocnění.

Prospektivní studie souboru pacientů s časnou polyartritidou přiznávají anti-Sa protilátkám nejvyšší prediktivní hodnotu pro závažné formy revmatoidní artritidy. V současné době lze ke stanovení anti-Sa protilátek použít komerčně dostupné ELISA soupravy.

2.4.2.1.5 Anti-keratinové (AKA) a antiperinukleární (APF) protilátky

Ačkoli anti-keratinové protilátky popsali před více než padesáti lety Young et al., byl až v roce 1993 identifikován antigen – lidský epidermální protein filagrin. Schellekens et al. následně dokázali, že APF/AKA anti-filagrinové protilátky rozpoznávají epitopy obsahující nestandartní aminokyselinu citrulin. AKA mají pro RA relativně vysokou specifitu přesahující 70%. Senzitivita se dle různých studií pohybuje mezi 36 – 59 % [150]. Anti-keratinové protilátky se vyšetřují ze séra či kloubního punktátu a princip testu spočívá v detekci autoprotilátek nepřímou imunofluorescencí (IFA) na substrátu stratum corneum krysích jícnu. Pozitivita průkazu může předcházet manifestaci kloubních symptomů. Anti-keratinové protilátky se objevují až u 40% pacientů s RA, z nichž přibližně 14% je RF negativních (tzv. séronegativní RA). Asociace mezi průkazem AKA a RF negativitou je tedy relativně úzká. U AKA pozitivních RA nemocných jsou ve významně zvýšených koncentracích nalézány cirkulující imunokomplexy; tato skutečnost může vysvětlovat asociaci AKA s těžkými formami onemocnění.

Anti-perinukleární protilátky (APF) poprvé popsali Nienhuis a Mandema [151], kteří zjistili, že protilátky v séru RA nemocných specificky označují perinukleární faktor. Ten je součástí řady takzvaných keratohyalinních granulí obklopujících jádro a je patrný v cytoplasmatických inkluzích epiteliálních buněk bukalní sliznice při nepřímé imunofluorescenci. APF pozitivitu vykazuje 49 až 91% pacientů RA, udávaná specifita kolísá mezi 73 a 99 % [150]. Protože jen nemnoho buněk bukalní sliznice může sloužit jako antigenní substrát - vysoké procento APF pozitivních buněk ústní sliznice vlastní pouze 5 % dárců - není test na APF rutinně používán. V souvislosti s vývojem rychlejších a citlivějších analytů (anti-CCP, anti-MCV) umožňujících diferenciální laboratorní diagnostiku RA včetně longitudinálního monitoringu hladin s ohledem na aktivitu onemocnění, se již průkaz APF protilátek v běžné laboratorní praxi nepoužívá.

2.4.2.1.6 Anti-A2/RA 33 protilátky

Anti-A2/RA 33 protilátky objevené v r. 1989 jsou namířeny proti jadernému proteinu, heterogennímu jadernému ribonukleoproteinu A2 (hnRNP-A2), který je zapojen do sestřihu a transportu mRNA. Nacházejí se přibližně u 1/3 RA nemocných, mohou však být zjištěny i u 20-30 % SLE pacientů a až 40 % nemocných MCTD (mixed connective tissue disease). Specifita pro RA činí 90 %. Pokud se diferenciálně diagnosticky vyloučí SLE

a MCTD, případně chybí protilátky asociované se SLE, stoupá specifita až na 96 %. Ostatní typy artritid jako osteoartritida, reaktivní artritida či psoriatická artritida, jsou obvykle anti-A2/RA 33 negativní. Protilátky mohou být přítomny v časných fázích onemocnění, zejména u RF negativních. Průkaz se podává ze séra či kloubního punktátu imunoblotingem, a recentně také komerčně dostupnými ELISA soupravami.

2.4.2.1.7 Anti-Bip protilátky

BiP (immunoglobulin binding protein) – intracelulární stresový glykoprotein původně pojmenovaný p68, byl v roce 1995 identifikován v séru u 60 % revmatoidních artritiků. Patří do rodiny proteinů tepelného šoku (heat shock proteins) lokalizované v endoplazmatickém retikulu. Původní studie určily specifitu anti-BiP protilátek 96 % pro RA, následné výzkumy však zjistily jejich přítomnost v nižších hladinách i u dalších revmatických chorob. BiP je ve vysokém množství nalézán v synoviální tkáni. V rutinním laboratorním provozu nejsou anti-BiP protilátky užívány k diferenciálně diagnostickým účelům.

3. SOUBORY PACIENTŮ

Studie zahrnuje 81 pacientů s RA, 72 žen a 9 mužů. Všichni sledovaní byli v průběhu let 2006-2007 vyšetřeni v revmatologické ambulanci Revmatologického ústavu v Praze a splnili revidovaná diagnostická kritéria American college of rheumatology (ACR) pro RA (Arnett et al. 1987). Viz tabulku číslo 3.

Tabulka 3: Diagnostická kritéria RA dle ACR, Arnett et al., 1987

Diagnostická kritéria RA podle ACR, Arnett et al., 1987
Ranní ztuhlost kloubů trvající nejméně 1 hodinu.
Artritida tří nebo více kloubních skupin z následujících (PIP, MCP, RC, lokty, kolena, kotníky, MTP) pozorovaná lékařem.
Artritida kloubů rukou (PIP, MCP, RC).
Symetrická artritida.
Revmatoidní uzly nad kostními prominencemi nebo extenzorovými plochami kolem kloubů pozorované lékařem.
Pozitivita RF jakoukoliv metodou, jejíž výsledky nejsou pozitivní ve více než 5 % populace.
Rentgenové změny typické pro RA na zadopředním snímku ruky a zápěstí, který musí obsahovat eroze nebo dekalcinace v postižených kloubech nebo blízko nich.
Pacient má RA při splnění alespoň 4 ze 7 kritérií. Kritéria 1 až 4 musí být přítomna nejméně 6 týdnů.

Sedmdesát osm probandů trpělo etablovanou RA, u které je interval mezi vznikem prvních příznaků a dnem vyšetření delší než 24 měsíců. Tři zbývající vykazovali časnou formu nemoci (časná RA - ČRA), která je definována jako období do vytvoření prvních rentgenologicky detekovatelných kloubních erozí, a jejíž délka trvání je omezena na 2 roky od manifestace prvních symptomů. Všichni sledovaní byli české národnosti a soubor tak reprezentuje vzorek kavkazské populace.

Pacienti byli pro většinu základních laboratorních parametrů diagnostikováni v biochemické a hematologické laboratoři Revmatologického ústavu v Praze. Nejdůležitější klinické a laboratorní charakteristiky souboru podávám v tabulce číslo 4.

Tabulka 4: *Klinická charakteristika pacientů s RA*

Klinická charakteristika pacientů s RA	
věk medián; rozpětí (roky)	55; 19-78
ženy / muži (počet,%)	72/9; 88,9/11,1
trvání choroby medián; rozpětí (roky)	12.2; 1; 3-52.2
FW, medián, rozpětí (mm/h)	21; 5-96
CRP; průměr; SD; medián	12,3; 18; 5.2

Referenční kontrolní data souboru 99 zdravých českých jedinců mi laskavě poskytl vedoucí genetické laboratoře RÚ v Praze RNDr. Peter Novota PhD.

4. METODY

4.1 Laboratorní stanovení autoprotilátek

4.1.1 Detekce revmatoidních faktorů IgG, IgA, IgM metodou ELISA

ELISA - imunoreakce se značenými protilátkami nebo též enzymoimunoanalýza, je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovení analytu (antigenu či protilátky) v neznámém vzorku. Obecně jde o reakci typu antigen – protilátka, která využívá tvorby imunokomplexů jako východiska k vysoce citlivým reakcím, za použití značených antigenů či protilátek. Indikátorem imunoanalytické metody je konjugát (analytem značený enzym). Detekci lze dle povahy substrátu provést spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky či luminometricky. Pro stanovení přítomnosti RF v izotopech IgM, IgA a IgG u sledovaného souboru nemocných jsem použil komerčně dostupnou ELISA soupravu firmy Test-Line, s.r.o. (Brno, ČR).

4.1.1.1 Princip metody (RF IgG)

Souprava pro 96 testů je určena k detekci revmatoidního faktoru z lidského séra či plazmy. Na vnitřní povrch jamek mikrotitrační destičky je jako antigen navázán lidský purifikovaný imunoglobulin izotypu IgG. Po aplikaci vzorků a kontrol dochází, v případě RF pozitivity k vazbě RF IgG s antigenem. Nenavázané zbytky vzorků a kontrol se vymyjí. Při druhé inkubaci se na specifické RF IgG protilátky naváže značená zvířecí protilátka proti humánnímu IgG konjugovaná křenovou peroxidázou – tzv. konjugát. Po odstranění nenavázaného konjugátu odsátím a promytím se detekuje peroxidázová aktivita aplikací jednosložkového substrátu s tetrametylbenzidinem (TMB). Enzymová reakce se ukončí přidáním zastavovacího roztoku. Intenzita žlutého zbarvení roztoku koreluje s koncentrací specifických IgG protilátek přítomných ve vzorku a stanovuje se fotometricky při 450nm. Souprava je určena pro semikvantitativní stanovení hladiny protilátek pomocí indexu positivity, nebo pro kvantitativní stanovení hladiny protilátek v jednotkách U/ml. Hladiny protilátek jsem stanovoval kvantitativně.

4.1.1.2 Složení soupravy:

1. potažená destička (strip) s navázaným antigenem, 12×8 jamek
2. kalibrátor 1: 2,0 ml negativní kontroly 5 U/ml lidského séra bez RF v pracovním ředění
3. kalibrátor 2: 2,0 ml tzv. CUT-OFF 20 U/ml lidského séra obsahujícího RF v hraniční koncentraci v pracovním ředění
4. kalibrátor 3: 2,0 ml 80 U/ml lidského séra obsahujícího RF v pracovním ředění
5. kalibrátor 4: 2,0 ml pozitivní kontroly 160 U/ml lidského séra obsahujícího RF v pracovním ředění
6. konjugát zvířecího imunoglobulinu proti lidským IgG značeným křenovou peroxidázou v pracovním ředění
7. ředící roztok vzorků: 2×50 ml pufru se stabilizátory bílkovin
8. TMB – Complete: 14 ml jednosložkového chromogenního substrátového roztoku obsahujícího TMB a H_2O_2
9. promývací roztok (20× conc.): 75 ml koncentrovaného pufru
10. zastavovací roztok: 15 ml roztoku obsahujícího kyselinu sírovou 1 mol/l

4.1.1.3 Vybavení potřebné k provedení testu:

jedno a vícekanálové pipety na 10, 100 a 1000 μ l a špičky na jednorázové použití, promývací zařízení, stopky, termostat na 37 °C, fotometr pro mikrotitrační destičky

4.1.1.4 Příprava reagensí a vzorku k vyšetření:

Promývací roztok (Wash Buffer) jsem zředil 1+19 díly H_2O (75 ml+1425 ml).

Ředící roztok vzorků je připraven k použití.

Enzymový konjugát je připraven k použití.

Substrát (TMB – Complete) je připraven k použití.

Zastavovací roztok (Stop solution) je připraven k použití.

Kalibrátory 1, 2, 3, 4, (Standard) jsou připraveny k použití.

Ředění vzorků:

Vzorky jsem naředil vzorkovým puftrem 1+100 (10 ml vzorku + 1 ml. ředícího roztoku).

Pracovní postup:

1. Reagencie jsem vyjmul z obalu a temperoval 60 min. při laboratorní teplotě.
2. Jamka A1 zůstává prázdná.

3. Pipetoval jsem:

100 µl kalibrátoru 1 (negativní kontroly) do 1 jamky.

100 µl kalibrátoru 2 (CUT OFF kontroly) do 2 jamek.

100 µl kalibrátoru 3 80 U/ml do 2 jamek.

100 µl kalibrátoru 4 (pozitivní kontroly) do 2 jamek.

100 µl testovaných sér ředěných 1+100 do zbývajících jamek.

4. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v termostatu 30 min. při 37 °C.

5. Obsah jamek jsem odsál a 5× promyl pracovním promývacím roztokem. Jamky jsem plnil po okraj. Zbytky roztoku jsem důkladně vyklepal do svého materiálu.

6. Do všech jamek kromě A1 jsem dávkoval 100 µl konjugátu.

7. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v termostatu 30 min. při 37°C.

8. Obsah jamek jsem odsál a 5× promyl pracovním promývacím roztokem. Jamky jsem naplnil po okraj.

9. Do všech jamek jsem dávkoval 100 µl jednosložkového substrátu TMB – Complete.

10. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v temnu 30 min. při 37 °C.

11. Reakci jsem zastavil přidáním 100 µl zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.

12. Do 30 min. po zastavení reakce jsem změřil na spektrofotometru při 450 nm intenzitu zbarvení.

4.1.1.5 Interpretace výsledků:

Souprava je určena pro semikvantitativní stanovení hladiny protilátek pomocí indexu positivity nebo pro kvantitativní stanovení protilátek v jednotkách U/ml.

hladina protilátek (U/ml) hodnocení:

negativní: < 18 U/ml

hraniční: 18 - 22 U/ml

pozitivní: > 22 U/ml

4.1.1.6 Princip metody RF IgA, RF IgM

Stanovení revmatoidních faktorů v izotypech IgA a IgM je v principu i pracovním postupu totožné s výše popsaným testem EIA RF IgG.

4.1.2 Stanovení revmatoidního faktoru latex fixačním testem

Pro stanovení výše titrů RF metodou LFT (latex fixační test) jsem použil komerčně dostupnou soupravu SERODIA (firma Fujirebio, San Diego, USA).

4.1.2.1 Princip metody LFT

SERODIA-RA (RAPA) je in vitro diagnostická testovací sada založená na pasivní aglutinaci umělých želatinových nosičů senzibilizovaných denaturovaným králičím IgG. Užívá se pro průkaz revmatoidní artritidy měřením revmatoidního faktoru v lidském séru. Principiálně je v souladu s Waaler-Rose testem či jeho tzv. Hellerovou modifikací. Test detekuje především RF třídy IgM, mohou se v něm však uplatnit i RF ostatních IgG tříd. Je vypracován v titrační modifikaci, výši nalezených titrů nelze individuálně srovnávat (přestože je komparace kvalitativně hodnocených výsledků poměrně příznivá) s koncentrací RF nalezenou kinetickými, nebo ELISA metodami.

4.1.2.2 Složení soupravy:

1. reconstituting solution (A) 1× 12 ml
2. ředící roztok vzorků (B) (sample diluent) 1× 12 ml
3. senzibilizované lyofilizované (C) částice 5× 1,5 ml
4. nesenzibilizované lyofilizované (D) částice 3× 0,5 ml
5. pozitivní kontrola lyofilizovaná (E) 1× 0,5 ml

4.1.2.3 Vybavení potřebné k provedení testu:

mikrotitrační U destička 8×12 jamek, dilutor na 25 µl, pro ředění vzorků, kapátko kalibrované na 25 µl, vibrační třepačka, optická čtečka pro interpretaci výsledků

4.1.2.4 Příprava reagensů a vzorků k vyšetření:

Reconstituting solution (A) je připraven k použití.

Ředící roztok vzorků (B) je připraven k použití.

Senzibilizované částice (C) jsem relyofilizoval 6 ml roztoku A.

Nesenzibilizované částice (D) jsem relyofilizoval 1,5 ml roztoku A.

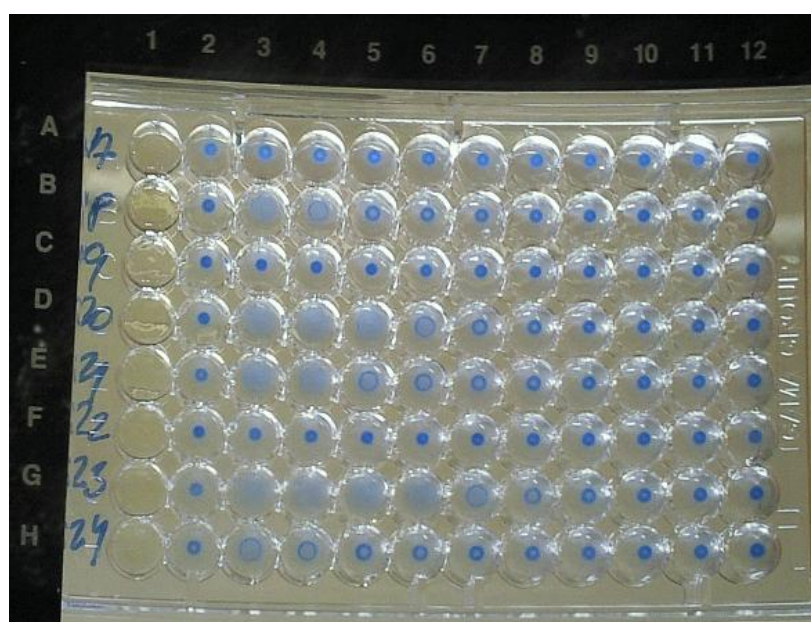
Pozitivní kontrolu jsem relyofilizoval 0,5 ml roztoku A.

4.1.2.5 Pracovní postup:

1. Do jamek první řady mikrotitrační destičky jsem pipetoval 100 μ l roztoku B.
2. Do ostatních jamek 25 μ l roztoku B.
3. Do jamek první řady jsem připipetoval 25 μ l vyšetřovaného vzorku (sérum).
4. Od první jamky jsem přenesl 25 μ l (ředěného séra) a ředil geometrickou řadou.
5. Do druhých jamek jsem připipetoval 25 μ l roztoku D.
6. Do jamek třetí až dvanácté řady jsem připipetoval 25 μ l roztoku C.
7. Protřepal jsem destičku 30s na třepačce.
8. Inkuboval jsem destičku 3 hodiny při pokojové teplotě.
9. Odečetl jsem výši titrů na optické čtečce.

Provedení pozitivní kontroly:

První jamku jsem ponechal prázdnou, do druhé napipetoval 50 μ l pozitivní kontroly. Další postup byl obdobný jako v případě vzorků.



Obr. 5: Výsledný obraz detekce RF Latex-fixačním testem

4.1.2.6 Interpretace výsledků

Výsledky vyšetření RF metodou LFT jsou uváděny v titrech.

negativní: < 80 t

pozitivní: > 80 t

4.1.3 Detekce anti-CCP IgG metodou ELISA

Pro stanovení anti-CCP IgG protilátek u sledovaného souboru nemocných jsem použil komerčně dostupnou ELISA soupravu od firmy Test-Line, s.r.o. (Brno, ČR).

4.1.3.1 Princip metody anti-CCP IgG

Souprava pro 96 testů je určena ke stanovení specifických RA protilátek proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP2) izotypu IgG v lidském séru či plazmě metodou ELISA, typ sandwich, tj. pevná fáze / antigen / protilátka / značená protilátka. Jako antigen slouží citrulinované syntetické peptidy 2. generace (CCP2). Značenou protilátkou je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG konjugovaná křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí za pomoci substrátu s tetrametylbenzidinem (TMB). Pozitivita se manifestuje modrým zabarvením, které se zastavovacím roztokem mění na žluté, jehož intenzita je úměrná koncentraci specifických IgG protilátek přítomných ve vzorku. Žlutá intenzita zabarvení se měří fotometrem při vlnové délce 450 nm. Souprava je určena pro semikvantitativní stanovení hladiny protilátek pomocí indexu positivity nebo pro kvantitativní stanovení protilátek v jednotkách U/ml.

4.1.3.2 Složení soupravy:

1. potažená destička (strip) s navázaným antigenem, 12×8 jamek
2. kalibrátor 1: 2,0 ml negativní kontroly 10U/ml, lidského séra bez obsahu anti-CCP v pracovním ředění
3. kalibrátor 2: 2,0ml tzv. CUT-OFF 20U/ml, lidského séra obsahujícího anti-CCP v hraniční koncentraci, v pracovním ředění
4. kalibrátor 3: 2,0ml 130U/ml lidského séra obsahujícího anti-CCP v pracovním ředění
5. kalibrátor 4: 2,0ml pozitivní kontroly 800U/ml lidského séra obsahujícího RF v pracovním ředění
6. konjugát zvířecího imunoglobulinu proti lidským IgG značeným křenovou peroxidázou v pracovním ředění
7. ředící roztok vzorků: 2×55ml pufru se stabilizátory bílkovin v pracovním ředění
8. TMB-Complete: 15ml jednosložkového chromogenního substrátového roztoku obsahujícího TMB a H₂O₂
9. promývací roztok (20× conc.): 75 ml koncentrovaného pufru
10. zastavovací roztok: 15 ml roztoku obsahujícího kyselinu sírovou 1 mol/l

4.1.3.3 Vybavení potřebné k provedení testu:

nastavitelné pipety na 10, 100 a 1000 μl a špičky na jednorázové použití, promývací zařízení, stopky, termostat na 37 °C, fotometr pro mikrotitrační destičky

4.1.3.4 Příprava reagensů:

Promývací roztok (Wash Buffer) se zředí 1+19 díly H_2O (75 ml+1425 ml).

Konjugát je v pracovní koncentraci připraven k použití.

Substrát (TMB – Complete) je připraven k použití.

Zastavovací roztok (Stop solution) je připraven k použití.

Kalibrátory 1, 2, 3, 4, (Standard) jsou připraveny k použití.

Ředění vzorků:

Ředění vzorků jsem prováděl vzorkovým pufrům 1+100 (10ml vzorku + 1 ml. ředícího roztoku).

4.1.3.5 Pracovní postup:

1. Reagencie jsem vyjmul z obalu a temperoval 60 min. při laboratorní teplotě.
2. Pipetoval jsem: 100 μl ředícího roztoku vzorků do jamky A1 (blank)
 - a. 100 μl kalibrátoru 1 (negativní kontroly) do 1 jamky.
 - b. 100 μl kalibrátoru 2 (CUT OFF kontroly) do 2 jamek.
 - c. 100 μl kalibrátoru 3 130 U/ml do 2 jamek.
 - d. 100 μl kalibrátoru 4 (pozitivní kontroly) do 2 jamek.
 - e. 100 μl testovaných sér ředěných 1+100 do zbývajících jamek.
3. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v termostatu 30 min. při 37 °C.
4. Obsah jamek jsem odsál a 5 \times promyl pracovním promývacím roztokem. Jamky jsem plnil po okraj. Zbytky roztoku jsem důkladně vyklepal do svého materiálu.
5. Do všech jamek jsem napipetoval 100 μl konjugátu.
6. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v termostatu 30 min. při 37°C.
7. Obsah jamek jsem odsál a 5 \times promyl pracovním promývacím roztokem. Jamky jsem naplnil po okraj. Zbytky roztoku jsem důkladně vyklepal do svého materiálu.
8. Do všech jamek jsem napipetoval 100 μl jednosložkového substrátu TMB – Complete.
9. Destičku jsem přiklopil víčkem a inkuboval v temnu 30 min. při 37°C.
10. Reakci jsem zastavil přidáním 100 μl zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech, jako byl dávkován substrát.

11. Do 30 min. po zastavení reakce jsem změřil intenzitu zbarvení roztoků v jamkách na spektrofotometru při 450 nm.

4.1.3.6 Interpretace výsledků

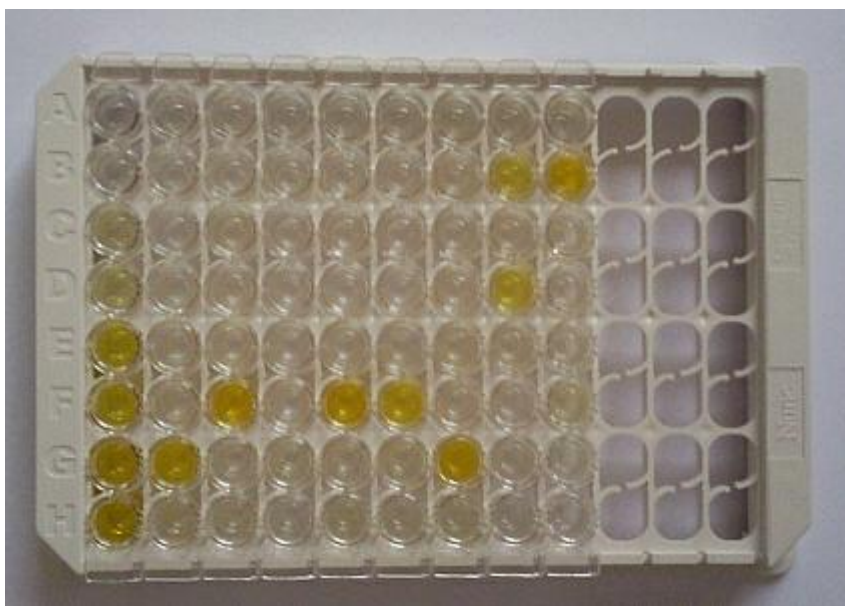
Souprava je určena pro semikvantitativní stanovení hladiny protilátek pomocí indexu pozitivity nebo pro kvantitativní stanovení protilátek v jednotkách U/ml.

hladina protilátek (U/ml) hodnocení:

negativní: < 18 U/ml

hraniční: 18 - 22 U/ml

pozitivní: > 22 U/ml



Obr. 6: Výsledný obraz detekce anti-CCP protilátek

4.1.4 Stanovení anti-MCV protilátek metodou ELISA

Anti-MCV představuje imunometrický enzymový test na pevné fázi (ELISA) pro kvantitativní měření IgG třídy autoprotiátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (MCV) v lidském séru nebo plasmě. Test je určen pro in vitro diagnostické použití jako pomůcka při diagnostice revmatoidní artritidy.

Pro stanovení přítomnosti anti-MCV IgG protilátek u sledovaného souboru nemocných jsem použil komerčně dostupnou ELISA soupravu od firmy Orgentec (Mainz, Deutschland).

4.1.4.1 Princip metody

Mutovaný citrulinovaný vimentin (MCV) je vázán v mikrojammkách. Protilátky proti tomuto antigenu, pokud je přítomen ve zředěném séru či plazmě, se váží na příslušný antigen. Promytím se z jamek odstraňují nespecifické složky séra a plazmy. Křenovou peroxidázou (HRP) konjugované králičí protilátky proti lidskému IgG imunologicky detekují vázané pacientovy protilátky a utvářejí komplex konjugát / protilátka / antigen. Promytím se z jamek odstraní nenavázaný konjugát. Enzymový substrát v přítomnosti vázaného konjugátu hydrolyzuje na formu modré barvy. Přídavek kyseliny zastaví reakci vytvářející konečný žlutý produkt. Intenzita této žluté barvy se měří fotometricky při 450 nm. Sytost barvy je přímo úměrná koncentraci IgG protilátek přítomných v původním vzorku.

4.1.4.2 Složení soupravy:

1. mikrotitrační destička obsahující 12 modulů s 8 jamkami v každém z nich, potažená vysoce purifikovaným MCV
2. kalibrační roztoky (A-F): 6 ampulí o obsahu 1,5 ml s protilátkami třídy IgG v sérové / pufové matrici (PBS, BSA, NaN₃ < 0,1% (w/w)), obsahující: IgG: 0; 20; 40; 100; 300; a 1000 U/ml
3. kontrolní roztoky: 2 ampule o obsahu 1,5 ml anti-MCV v sérové / pufové matrici (PBS, BSA, NaN₃ < 0,1% (w/w)), pozitivní (1) a negativní(2)
4. pufr na ředění vzorků: 1 ampule o obsahu 20 ml (Tris, NaN₃ < 0,1% (w/w)), žlutý, koncentrát (5×)
5. konjugát: 1 ampule o obsahu 15 ml (PBS, PROCLIN300 < 0,5% (v/v)), světle červený, obsahující polyklonální králičí anti-humánní imunoglobulin G; značený křenovou peroxidázou
6. substrát TMB: 1 ampule o obsahu 15 ml 1 ampule o obsahu 15 ml
7. zastavovací (stop) roztok (obsahuje kyselinu sírovou)
8. promývací roztok: 1 ampule o obsahu 20 ml (NaN₃ < 0,1% (w/w)), koncentrát (50×)

4.1.4.3 Vybavení potřebné k provedení testu:

mikrotitrační čtečka – reader schopná koncových měření 450 nm, vícekanálový dávkovač nebo pipeta pro opakované dávkování o obsahu 100 μ l, vortex – vířivé mísidlo, pipety o objemech 10 μ l, 100 μ l a 1000 μ l, laboratorní časomíra, software pro redukci dat, destilovaná nebo deionizovaná voda, odměrné válce o objemech 100 ml a 1000 ml, plastová nádoba pro skladování promývacího roztoku

4.1.4.4 Příprava reagensů:

Příprava vzorkového pufru:

Naředit jsem obsah každé ampule koncentrovaného vzorkového pufru (5 \times) destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 100 ml před použitím.

Příprava promývacího roztoku:

Naředit jsem obsah každé ampule koncentrovaného promývacího pufru (50 \times) destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000 ml před použitím.

Příprava vzorku:

Všechny vzorky jsem naředit pufrem v poměru 1:100. Do 10 μ l vzorku v polystyrenové zkuševce jsem přidal 990 μ l vzorkového pufru.

4.1.4.5 Pracovní postup

1. Připravil jsem si dostatečný počet mikrotitračních destiček pro příslušný počet kontrolních vzorků a vzorků odebraných pacientům.
2. Napipetoval jsem do jamek po 100 μ l kalibračních roztoků, kontrolních roztoků a ředěných vzorků pacientů.
3. Inkuboval jsem po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20 – 28 °C).
4. Odstranil jsem obsah mikrojamek a promyl je třikrát pomocí 300 μ l promývacího roztoku.
5. Do každé jamky jsem přidal 100 μ l enzymového konjugátu.
6. Inkuboval jsem po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
7. Odstranil jsem obsah mikrojamek a promyl je třikrát pomocí 300 μ l promývacího roztoku.
8. Do každé jamky jsem přidal 100 μ l roztoku TMB substrátu.
9. Inkuboval jsem po dobu 15 minut při pokojové teplotě.

10. Do každé jamky jsem přidal 100 μ l zastavovacího roztoku a inkuboval po dobu 5 minut při pokojové teplotě.

11. Odečetl jsem optickou denzitu při vlnové délce 450 nm.

4.1.4.6 Interpretace výsledků

Souprava je určena pro semikvantitativní stanovení hladiny protilátek pomocí indexu positivity nebo pro kvantitativní stanovení protilátek v jednotkách U/ml.

hladina protilátek (U/ml) hodnocení:

negativní: < 20 U/ml

pozitivní: > 20 U/ml



Obr. 7: Výsledný obraz detekce anti-MCV protilátek

4.1.5 Stanovení ANA protilátek metodou nepřímé imunofluorescence (IIF)

Pro stanovení přítomnosti ANA protilátek metodou IIF u sledovaného souboru nemocných jsem použil komerčně dostupnou soupravu od firmy Immunoconcepts (San Diego, USA).

4.1.5.1 Princip metody

ANA test firmy Immunoconcepts užívá techniky nepřímé imunofluorescence poprvé popsané v roce 1954 Wellerem a Coonsem [152]. Séra se inkubují s antigenovým substrátem, aby se dosáhlo specifické vazby autoprotilátek k buněčnému jádru. Pokud jsou ANA přítomny, tvoří se stabilní antigen-protilátkový komplex. Po promytí, které odstraní

nespecificky navázané protilátky, se substrát inkubuje s anti–humánní protilátkou konjugovanou s fluoresceinem. V případě pozitivního výsledku se vytvoří stabilní třídílný komplex složený z fluorescenční protilátky vázané k lidské antinukleární protilátce, která se pojí s nukleárním antigenem. Tento komplex je možné vizualizovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. U pozitivních vzorků se buněčné jádro zobrazí jako jablkově zelená fluorescence se vzorem charakterizujícím zejména distribuci nukleárního antigenu v rámci buňky. V případě negativity se v jádře jasně nezobrazí patrný vzor nukleární fluorescence.

4.1.5.2 Složení soupravy:

Reaktivní činidla:

1. substrátová sklička se substrátem Hep-2 buněk
2. SSA/Ro pozitivní kontrola: 1,0 ml pozitivní lidské kontrolní sérum s protilátkou specifickou k SSA/Ro antigenům
3. homogenní pozitivní kontrola: 1,0 ml pozitivního lidského kontrolního séra s protilátkou specifickou k DNA a / nebo DNP jaderným antigenům
4. pozitivní kontrola: 1,0 ml pozitivního lidského kontrolního séra s protilátkou specifickou k Sm a / nebo RNP nukleárním antigenům
5. nukleolární (jadérková) pozitivní kontrola: 1,0 ml pozitivního lidského kontrolního séra s protilátkou specifickou k nukleolárním antigenům
6. centromérová pozitivní kontrola: 1,0 ml pozitivního lidského kontrolního séra s protilátkou specifickou k chromozomům
7. negativní kontrolní sérum: 1,0 ml negativního lidského kontrolního séra
8. fluorescenční protilátkové činidlo: kozí anti-humánní IgG (těžké a lehké řetězce) konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC)

Nereaktivní složky:

1. PBS pufr (prášek) - 1 sáček na 1 l H₂O
2. semi–permanentní montovací médium, 5,0 ml montovacího média na bázi glycerolu
3. krycí sklička

4.1.5.3 Vybavení potřebné k provedení testu:

pipety o objemu 20-25 μ l, Pasteurovy pipety, sérologické pipety, 1 l nádoba (PBS pufr), deionizovaná nebo destilovaná voda, zkumavky pro přípravu ředění séra, Petriho misky nebo jiné komůrky pro inkubaci, papírové ručníky, rukavice na jedno použití, lab časovač, fluorescenční mikroskop vybavený filtrem 495 nm excitačním filtrem a 515 nm bariérovým filtrem

4.1.5.4 Příprava reagensů:

PBS 1 sáček jsem zředil 1 l dH₂O.

Fluorescenční činidlo připraveno k použití.

Montovací médium připraveno k použití.

Evansova modř: 5 kapek nakapat do kyvety s PBS.

Ředění vzorků: ředil jsem PBS.

Screening: 1:40 (5 μ l vzorku + 190 μ l PBS).

Titrace: 1:80 (5 μ l vzorku + 390 μ l PBS, 1:160 (90 μ l vzorku + 90 μ l PBS) a dále jsem ředil dvojkovou řadou.

4.1.5.5 Pracovní postup:

1. Napipetoval jsem na sklíčko 20 μ l naředěných sér.
2. Inkuboval jsem sklíčka 30 min. ve vlhké komůrce.
3. Opláchl jsem sklíčka stříčkou s PBS.
4. Vložil jsem sklíčka do kyvety s PBS a nechal promýt 10 min.
5. Vyměnil jsem PBS a znovu nechal promývat 10 min.
6. Opakoval jsem krok 5.
7. Přidal jsem 1 kapku fluorescenčního činidla.
8. Opakoval jsem postupně kroky 2, 3, 4, 5 a 6.
9. Obarvil jsem sklíčka po dobu 1 min. v kyvetě s PBS a 5 kapkami Evansovi modři.
10. Opláchl jsem sklíčka PBS.
11. Přidal jsem 1 kapku montovacího média a přikryl krycími sklíčky.
12. Výsledný fluorescenční obraz jsem odečetl pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.1.5.6 Interpretace výsledků

pozitivní fluorescenční obraz: pozitivní

negativní fluorescenční obraz: negativní

4.2 Detekce alel HLA II. třídy metodou SSP

Pro stanovení alel HLA II. třídy metodou SSP jsem použil komerčně dostupnou soupravu Olerup SSP DR low resolution od firmy QIAGEN.

4.2.1 Princip metody

SSP (Sequence Specific Primers) je molekulárně biologická technika vyvinutá na počátku 90. let 20. století a založená na principu alelicky specifické PCR. Alely či skupina alel odpovídající dané sérologické specifitě jsou amplifikovány párem primerů zcela komplementárních ke kódujícím sekvencím. Přítomnost produktu po proběhlé reakci tak koresponduje s přítomností specifické sekvence ve vyšetřované DNA. Analýza a identifikace produktu spočívá v elektroforetické separaci na agarózovém gelu, vizualizaci pomocí barvení (přítomnost či nepřítomnost specifického signálu) a následné interpretaci pomocí přiložené tabulky, případně počítačovým vyhodnocením (srovnáním pozitivních signálů získaného vzorku se vzory obsaženými v databázi známých alel).

Obecně je systém reprezentován variabilním počtem paralelně běžících PCR reakcí, každá s párem primerů pro amplifikaci specifických sekvenčních motivů alel. Počet primerů koreluje s variabilitou zkoumaného úseku.

4.2.2 Složení soupravy

Jeden test z užití typizační soupravy Olerup SSP DR low resolution společnosti QIAGEN je složen z 23+1 PCR reakce. Obsahuje 5' a 3' primery pro sdružování DRB1*0101 až DRB1*1001 alel do odpovídajících sérologických skupin (DR1 až DR 18), jakož i primerových párů pro rozpoznání DRB3, DRB4 a DRB5 alelových skupin (celkem 23 reakcí) + kontrolní pár primerů odpovídající nealelickým sekvencím (1 reakce - negativní kontrola). Sada je dodávána ve 2 variantách, licencované a nelicencované: s Taq polymerázou či bez ní. Pracoval jsem s nelicencovanými kity a použil Taq DNA polymerázy firem Fermentas a Roche. Komerční kit Olerup SSP DR low resolution tedy obsahuje 48 testů, 1 test představuje strip o 24 jamkách s lyofilizovanými primery (23+1). Součástí sady je PCR Master Mix.

4.2.3 DNA izolace

Pro SSP typizaci je vyžadována DNA ve vysokém stupni čistoty. Výrobce typizační sady doporučuje specifický způsob izolace DNA, za použití jím dodávaného příslušenství (QIAamp Blood Mini Kit). Nevylučuje však možnost alternativní extrakce. Pro účely této práce byl užit izolační kit společnosti Gentra. Doporučená optimální koncentrace DNA k provedení testu je 30 ng/μl.

K izolaci bylo odebráno 10 ml periferní krve.

4.2.3.1 Postup izolace DNA

1. Suspenze lymfocytů byla indukována při 37°C do následujícího dne.
2. K lyzátu bylo přidáno 1,4 ml 5M NaCl a provedena deproteinace chloroformem.
3. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 10 000 otáčkách/min při 4°C. Vodná fáze s DNA byla přenesena do čisté zkumavky.
4. Přidáním 4 ml ledového isopropanolu a lehkým promícháním došlo k vysrážení DNA.
5. Vlákna DNA byla namotána na vyžíhaný skleněný háček, opláchnuta 70 % etanolem a osušena asi 10 minut na vzduchu.
6. DNA byla rozpuštěna ve 250 μl TE pufru a uchována při - 20°C.
7. Pelet byl opakovaně promyt 20 ml fyziologickým roztokem a suspenze lymfocytů byla centrifugována po dobu 10 minut při 5000 otáčkách/min při 4°C.
8. K promytému peletu lymfocytů bylo přidáno 0,5 ml fyziologického roztoku, 3 ml FASANA a 20 μl proteinázy K. Lymfocyty byly důkladně resuspendovány.
9. Suspenze lymfocytů byla indukována při 37°C do následujícího dne.
10. K lyzátu bylo přidáno 1,4 ml 5M NaCl a provedena deproteinace chloroformem.
11. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 10 000 otáčkách/min při 4°C. Vodná fáze s DNA byla přenesena do čisté zkumavky.
12. Přidáním 4 ml ledového isopropanolu a lehkým promícháním došlo k vysrážení DNA.
13. Vlákna DNA byla namotána na vyžíhaný skleněný háček, opláchnuta 70 % etanolem a osušena asi 10 minut na vzduchu.
14. DNA byla rozpuštěna ve 250 μl TE pufru a uchována při - 20°C.

Vzorek DNA byl naředěn na požadovanou koncentraci 30 ng/μl.

4.2.4 PCR amplifikace

4.2.4.1 Postup PCR

1. Do jamky č. 24 (negativní kontrola) jsem přidal 7 μl dH₂O a 3 μl PCR Master Mixu s 0,08 μl Taq polymerasy.
2. Pro přípravu PCR amplifikace jsem připravil směs obsahující komponenty, viz tabulku číslo 5:

Tabulka 5: PCR mix

Komponenta	Množství
DNA	$N \times 2 \mu\text{l}$
PCR Master Mix	$N \times 3 \mu\text{l}$
dH ₂ O	$N \times 5 \mu\text{l}$
Taq polymerasa (5U/ μl)	$N \times 0,08 \mu\text{l}$
„N“ = počet PCR reakcí na jeden test.	

3. Do zbývajících 23 jamek jsem pipetoval po 10 μl směsi připravené dle bodu 2. Stripy musí být během přípravy umístěny v chladicích nosičích.
4. Stripy jsem zvortexoval a umístil do thermocycleru.
5. PCR reakce probíhala v thermocyklerech Multi Gene TC9600 firmy Labnet s 96 jamkovým blokem podle následujícího rozpisu teplot:

Tabulka 6: Schema SSP PCR reakce

1.	1 cyklus	Denaturace	94°C	2 min.
2.	10 cyklů	Denaturace	94°C	10 s
		Annealing a extenze	65°C	60 s
3.	20 cyklů	Denaturace	94°C	10 s
		Annealing	61°C	50 s
		Extenze	72°C	30 s
		Konec programu	4°C	forever

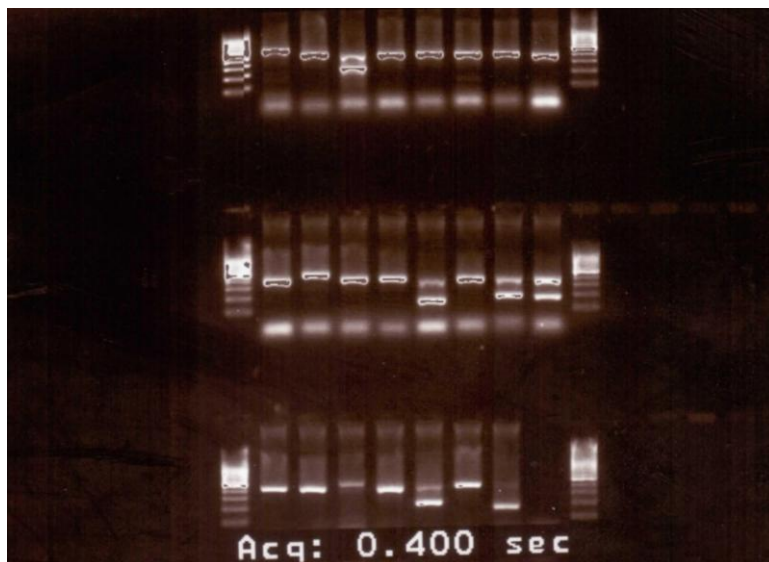
4.2.4.2 Detekce PCR produktů

1. Po amplifikaci jsem PCR produkty elektroforeticky rozdělil v 1,5% agarózovém gelu, v 0,5X TBE pufru při napětí 8-10 V/cm po dobu 30 minut. Schéma přípravy gelu je uvedeno v tabulce číslo 7.

Tabulka 7: Příprava agarózového gelu pro detekci PCR produktů

Komponenta	Množství
Agaróza	3 g
0,5 × TBE	150 ml
Ethidium bromid (1mg/ml)	80 µl

2. Gel jsem vyfotografoval na UV lampě.
3. Výsledek jsem interpretoval pomocí počítačového programu HELMBERGSCORE™.



Obr. 8: Výsledný obraz HLA typizace II. třídy metodou SSP

5. VÝSLEDKY

5.1 Statistická analýza

Statistické vyhodnocení dat jsem provedl pomocí programů MS Excel a GraphPad Prism 5. Shodu genotypových distribucí s Hardy-Weinbergovým equilibriem jsem testoval pomocí chí-kvadrát testu. Jednotlivé alelické frekvence DRB1 genu jsem počítal standardní metodou. Významnost rozdílu alelických frekvencí u definovaných skupin pacientů jsem hodnotil Fischer exact testem, při kalkulaci P hodnot jsem uplatnil Bonferroniho korekci. Za signifikantní jsem považoval hladinu významnosti 5 %. Sílu pozorovaných vztahů jsem odhadl výpočtem poměru šancí (odds ratio), kalkulovaném Fischer exact testem. K porovnání výše hladin sledovaných autoprotilátek u DRB1*04 pozitivních a DRB1*04 negativních pacientů jsem vzhledem k nestejně početným souborům použil nepárový t-test s Welschovou korekcí.

5.2 Výsledky detekce autoprotilátek

Ze vzorků séra 81 nemocných s RA byly stanoveny hladiny klinicky nejvýznamnějších autoprotilátek. Provedeny byly následující testy.

5.2.1 Vyšetřované autoprotilátky

5.2.1.1 ANA

Detekci antinukleárních protilátek jsem provedl komerčně dostupnou diagnostickou soupravou od firmy Immunoconcepts (San Diego, USA) metodou nepřímé imunofluorescence. Při vlastním provedení testu jsem postupoval dle pokynů výrobce. Za pozitivní byly považovány nálezy o výši titru 80 a vyšší. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

5.2.1.2 RF LFT

K průkazu revmatoidních faktorů metodou LFT jsem použil komerčně dostupnou soupravu od firmy Fujirebio (Fujirebio, San Diego, USA). Při vlastním provedení testu jsem

postupoval dle pokynů výrobce. Test vykazuje 96% senzitivitu a 60% specifitu. Výsledné titry jsou vyjádřeny jako poslední titr ředění séra kdy dojde k aglutinaci. Za pozitivní jsem považoval titr vyšší než 1:80. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

5.2.1.3 RF ELISA IgG, IgA, IgM

Revmatoidní faktor ve třídách IgM, IgA a IgG jsem stanovil pomocí komerčně dostupné ELISA soupravy od firmy Test-Line, s.r.o. (Test-Line, s.r.o., Brno, ČR). Při vlastním provedení testu jsem postupoval dle pokynů výrobce. Výrobce udávaná senzitivita, respektive specifita testu činí pro IgG RF 93,9% resp 94,1%, pro IgA RF 96,6% resp. 93,6%., pro IgM RF 97,9% resp 95,1%. Za pozitivní jsem považoval hladinu vyšší než 22 U/ml. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

5.2.1.4 Anti-CCP

K vyšetření protilátek proti cyklickým citrulinovaným peptidům jsem použil komerčně dostupnou soupravu od firmy Test-Line (Test-Line, s.r.o., Brno, ČR). Při vlastním provedení testu jsem postupoval dle pokynů výrobce. Senzitivita testu je výrobcem udávána 98,6 %, specifita 98,6 %. Za pozitivní byla považována hladina vyšší než 22 U/ml. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

5.2.1.5 Anti-MCV

K vyšetření protilátek proti mutovanému či modifikovanému vimentinu jsem použil komerčně dostupnou soupravu od firmy Orgentec (Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany). Při vlastním provedení testu jsem postupoval dle pokynů výrobce. Senzitivita testu je výrobcem udávána 82 %, specifita 97%. Za pozitivní byla považována hladina vyšší než 22 U/ml. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 8.

5.2.2 Výskyt protilátek u souboru nemocných s RA

Četnost výskytu jednotlivých protilátek vyšetřovaných v rámci diferenciální laboratorní diagnostiky RA u sledovaného souboru je uveden v tabulce číslo 8.

Tabulka 8: Výskyt protilátek u souboru 81 pacientů s RA.

Výskyt protilátek v souboru 81 pacientů s RA							
	ANA (titr)	RF LFT (titr)	RF ELISA (U/ml)			anti-CCP (U/ml)	anti-MCV (U/ml)
			G	A	M		
Poč. pac. poz.	30	34	17	14	21	66	60
Poč. pac. neg.	51	47	64	67	60	15	21
Prům. hodnota	85,9	543,2	11,8	13,1	18,1	433,0	69,6
Medián	0,0	0,0	6,2	8,0	8,1	228,3	62,8
SD	168,2	1 367,1	12,2	15,3	23,7	469,1	62,0
Minimum	0,0	0,0	0,6	0,7	0,4	0,5	0,2
Maximum	640,0	10 240,0	57,9	87,2	128,3	2 081,0	309,4

5.2.3 Rozdělení vyšetřovaného souboru na základě přítomnosti či absence autoproti látek

Na základě přítomnosti či absence jednotlivých autoproti látek jsem soubor rozdělil na podskupiny, které jsou uvedeny v tabulce číslo 9.

Tabulka 9: Výskyt autoprotilátek u sledovaného souboru nemocných s RA.

Protilátka	Výsledek vyšetření	Počet nemocných
ANA	pozitivní	30
ANA	negativní	51
RF (LFT)	pozitivní	34
RF (LFT)	negativní	47
RF (IgG)	pozitivní	17
RF (IgG)	negativní	64
RF (IgA)	pozitivní	14
RF (IgA)	negativní	67
RF (IgM)	pozitivní	21
RF (IgM)	negativní	60
anti-CCP	pozitivní	66
anti-CCP	negativní	15
anti-MCV	pozitivní	60
anti-MCV	negativní	21

5.3 Výsledky typizace HLA II. třídy u pacientů s RA

Stanovení distribuce HLA-DRB1 alel v souboru, rozlišení nemocných na základě nosičství alel pro SE v souvislosti s přítomností či absencí protilátkové aktivity byl jeden z hlavních úkolů studie.

5.3.1 Distribuce HLA-DRB1 alel v souboru 81 pacientů s RA

Nejčastěji zastoupenou HLA-DRB1 alelou byla HLA-DRB1*04 (HLA-DR4). V souboru jsem zaznamenal 43 pacientů DRB1*04 pozitivních, 12 nemocných mělo alelu DRB1*04 v homozygotní konstituci. Heterozygotní stav vykázalo 31 pacientů. Frekvence DRB1*04 alely činila 34 %. Distribuce HLA-DRB1 alel u vyšetřovaného souboru nemocných s RA je uvedena v tabulce číslo 10. Zbývající alely DRB1 genu nebyly v souboru detekovány.

Tabulka 10: Distribuce HLA-DRB1 alel u sledovaného souboru nemocných s RA.

DRB1 alela	Počet heterozygotů	Počet homozygotů	Absolut. frekv. alely	Relat. frekv. alely (%)
DRB1*01	15	1	17	10,5
DRB1*03	12	0	12	7,4
DRB1*04	31	12	55	34,0
DRB1*07	25	0	25	15,4
DRB1*08	4	0	4	2,5
DRB1*10	5	0	5	3,1
DRB1*11	10	1	12	7,4
DRB1*12	1	0	1	0,6
DRB1*13	6	1	8	4,9
DRB1*15	19	0	19	11,7
DRB1*16	4	0	4	2,5

5.3.2 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu mezi souborem pacientů s RA a souborem zdravých kontrol.

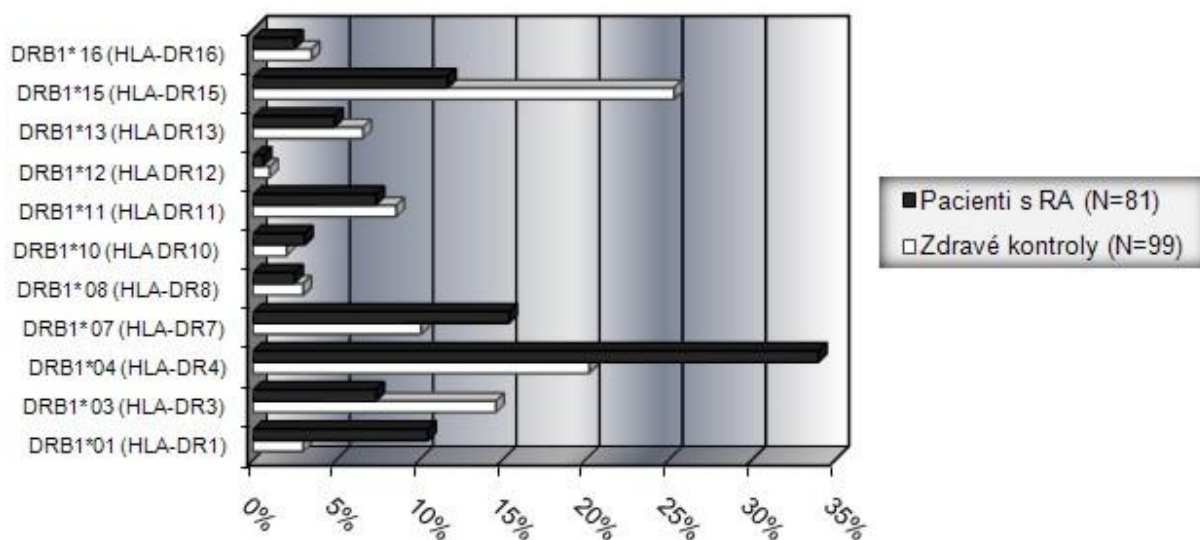
Porovnání mělo ověřit, zda jsou některé alely významně častěji asociovány s RA oproti zdravé kontrolní populaci. V obou sledovaných souborech (RA i kontroly) bylo rozložení genotypů DRB1 alel v souladu s hodnotami kalkulovanými na základě Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Hodnoty alelických frekvencí sledovaného souboru 81 RA pacientů a frekvence kontrolní zdravé české populace jsou uvedeny v tabulce číslo 11.

Tabulka 11: Relativní frekvence DRB1 alel detekovaných v souboru 81 pac.s RA, kontrolní data zdravé české populace.

DRB1 alela	RA (N=81)	Zdravé kontroly (N=99)
DRB1*01	0,105 (OR = 3,75)**	0,03
DRB1*03	0,074	0,146
DRB1*04	0,340 (OR =2,03)**	0,202
DRB1*07	0,154	0,101
DRB1*08	0,025	0,03
DRB1*10	0,031	0,02
DRB1*11	0,074	0,086
DRB1*12	0,006	0,101
DRB1*13	0,049	0,066
DRB1*15	0,117 (OR:0,39)**	0,253
DRB1*16	0,025	0,354

Porovnání frekvence DRB1 alel souboru pacientů s RA a souboru zdravých kontrol



Obr. 9: Grafické znázornění frekvencí DRB1 alel souborů pacientů a zdravých kontrol

Sledování významnosti rozdílu alelických frekvencí jednotlivých DRB1 alel mezi souborem pacientů s RA a souborem zdravých kontrol přineslo tyto výsledky:

U alel DRB1*01, DRB1*04 a DRB1*15 byl shledán významný rozdíl alelických frekvencí mezi RA pacienty a zdravou populací:

DRB1*01, $P = 0,0092$, $OR = 3,75$

DRB1*04, $P = 0,0078$, $OR = 2,03$

DRB1*15, $P = 0,0024$, $OR = 0,39$

Porovnání ostatních alel neukázalo signifikantní rozdíly alelických frekvencí ($P > 0,05$).

*Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v obou souborech zastoupeny s nízkou četností, jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souborech zastoupena pouze jednou (soubor pac.s RA) respektive dvakrát (zdravé kontroly), jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.*

5.3.3 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu v rámci souboru RA pacientů.

Na základě detekce jednotlivých autoprotilátek jsem soubor 81 pacientů rozdělil na 14 podskupin uvedených v tabulce číslo 9. Sledoval jsem distribuci jednotlivých DRB1 alel, srovnával jejich frekvence mezi skupinami pacientů s pozitivním a negativním nálezem konkrétní autoprotilátky. Cílem porovnání bylo zjistit, zda je některá DRB1 alela asociována s přítomností (pozitivitou) určité autoprotilátky.

5.3.3.1 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu ANA+ a ANA - pacientů.

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u ANA pozitivních a ANA negativních pacientů je uvedeno v tabulce 12.

Tabulka 12: Relativní frekvence DRB1 alel detekovaných v souboru 30 pacientů ANA+ a 51 pacientů ANA-.

DRB1 alela	ANA+ (N=30)	ANA- (N=51)
DRB1*01	0,1	0,1078
DRB1*03	0,0833	0,0686
DRB1*04	0,2833	0,3725
DRB1*07	0,0833	0,1961
DRB1*08	0,05	0,0098
DRB1*10	0	0,049
DRB1*11	0,0833	0,0686
DRB1*12	0,0167	0
DRB1*13	0,0833	0,0294
DRB1*15	0,15	0,098
DRB1*16	0,0667 ($OR = 16,33$)*	0

Sledování významnosti rozdílu alelických frekvencí jednotlivých DRB1 alel mezi soubory ANA+ a ANA- přineslo následující výsledky:

U alely DRB1*16 byl sice shledán významný rozdíl alelických frekvencí mezi ANA+ a ANA- pacienty, výsledky statistické analýzy DRB1*16 jsou však vzhledem k nízké četnosti zastoupení této alely v souboru na hranici validity.

DRB1*16, $P = 0,0357$, $OR = 16,33$

Porovnání ostatních alel neprokázalo signifikantní rozdíly alelických frekvencí ($P > 0,05$).

Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil.

5.3.3.2 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF LFT+ a RF LFT- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u RF LFT pozitivních a RF LFT negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 13.

Tabulka 13: Relativní frekvence DRB1 alel u nemocných RF LFT+ a RF LFT-

DRB1 alela	RF LFT+ (N=34)	RF LFT- (N=47)
DRB1*01	0,1471	0,0745
DRB1*03	0,0588	0,0851
DRB1*04	0,2941	0,3723
DRB1*07	0,1324	0,1702
DRB1*08	0,0147	0,0319
DRB1*10	0,0441	0,0213
DRB1*11	0,0588	0,0851
DRB1*12	0	0,0106
DRB1*13	0,0588	0,0425
DRB1*15	0,1618	0,0851
DRB1*16	0,0294	0,0213

Porovnání frekvence jednotlivých DRB1 alel neprokázalo signifikantní rozdíly ($P > 0,05$).

Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.

5.3.3.3 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgG+ a RF IgG- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgG (ELISA) pozitivních a RF IgG (ELISA) negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 14.

Tabulka 14: Relativní frekvence DRB1 alel u nemocných RFG+ a RFG-.

DRB1 alela	RFG+ (N=17)	RFG- (N=64)
DRB1*01	0,1176	0,1015
DRB1*03	0,0882	0,0703
DRB1*04	0,2352	0,3671
DRB1*07	0,147	0,1562
DRB1*08	0	0,0313
DRB1*10	0,0588	0,0234
DRB1*11	0,0294	0,0859
DRB1*12	0	0,0078
DRB1*13	0,1176	0,0313
DRB1*15	0,1764	0,1015
DRB1*16	0,0294	0,0234

Porovnání frekvence jednotlivých DRB1 alel neprokázalo signifikantní rozdíly ($P > 0,05$).

Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.

5.3.3.4 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgA+ a RF IgA- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgA (ELISA) pozitivních a RF IgA (ELISA) negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 15.

Tabulka 15: Relativní frekvence DRB1 alel u nemocných RFA+ a pacientů RFA-.

DRB1 alela	RFA+ (N=14)	RFA- (N=67)
DRB1*01	0,1429	0,097
DRB1*03	0,0357	0,0821
DRB1*04	0,3214	0,3433
DRB1*07	0,1071	0,1642
DRB1*08	0	0,0299
DRB1*10	0,0357	0,0299
DRB1*11	0	0,0896
DRB1*12	0	0,0075
DRB1*13	0,1429	0,0299
DRB1*15	0,1786	0,1045
DRB1*16	0,0357	0,0224

Porovnání frekvence jednotlivých DRB1 alel neprokázalo signifikantní rozdíly ($P > 0,05$).

Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.

5.3.3.5 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u RF IgM+ a RF IgM- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu RF IgM (ELISA) pozitivních a RF IgM (ELISA) negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 16.

Tabulka 16: Relativní frekvence DRB1 alelu nemocných RFM+ a RFM-.

DRB1 alela	RFM+ (N=21)	RFM- (N=60)
DRB1*01	0,119	0,1
DRB1*03	0,0714	0,075
DRB1*04	0,2857	0,3583
DRB1*07	0,1905	0,1417
DRB1*08	0	0,0333
DRB1*10	0,0476	0,025
DRB1*11	0	0,1
DRB1*12	0	0,0083
DRB1*13	0,0952	0,0333
DRB1*15	0,1429	0,1083
DRB1*16	0,0476	0,0166

Porovnání frekvence jednotlivých DRB1 alel neprokázalo signifikantní rozdíly ($P > 0,05$).

*Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.*

5.3.3.6 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u anti-CCP+ a anti-CCP- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u anti-CCP pozitivních a anti-CCP negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 17.

Tabulka 17: Relativní frekvence DRB1 alel u nemocných anti-CCP+ a anti-CCP-.

DRB1 alela	anti-CCP+ (N=66)	anti-CCP- (N=15)
DRB1*01	0,0984	0,1333
DRB1*03	0,0606	0,1333
DRB1*04	0,3863 (OR =4,09)*	0,1333
DRB1*07	0,1591	0,1333
DRB1*08	0,0227	0,0333
DRB1*10	0,0303	0,0333
DRB1*11	0,0606	0,1333
DRB1*12	0,0076	0
DRB1*13	0,053	0,0333
DRB1*15	0,0909	0,2333
DRB1*16	0,0303	0

Sledování významnosti rozdílu alelických frekvencí jednotlivých DRB1 alel mezi souborem anti-CCP+ a anti-CCP- přineslo tyto výsledky:

U alely DRB1*04 byl shledán významný rozdíl alelických frekvencí mezi anti-CCP+ a anti-CCP- pacienty.

DRB1*04, $P = 0,019$, $OR = 4,09$

Porovnání ostatních alel neprokázalo signifikantní rozdíly alelických frekvencí ($P > 0,05$).

*Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.*

5.3.3.7 Porovnání alelických frekvencí DRB1 genu u anti-MCV+ a anti-MCV- pacientů

Porovnání jednotlivých alelických frekvencí DRB1 genu u anti-MCV pozitivních a anti-MCV negativních pacientů je uvedeno v tabulce číslo 18.

Tabulka 18: Relativní frekvence DRB1 alel u nemocných anti-MCV+ a anti-MCV-.

DRB1 alela	anti-MCV+ (N=60)	anti-MCV- (N=21)
DRB1*01	0,1	0,119
DRB1*03	0,0583	0,119
DRB1*04	0,3917(OR = 2,74)*	0,1905
DRB1*07	0,15	0,1666
DRB1*08	0,025	0,0238
DRB1*10	0,0333	0,0238
DRB1*11	0,0583	0,119
DRB1*12	0,0083	0
DRB1*13	0,0583	0,0238
DRB1*15	0,8333	0,2143
DRB1*16	0,3333	0

Sledování významnosti rozdílu alelických frekvencí jednotlivých DRB1 alel mezi souborem anti-MCV+ a anti-MCV- přineslo následující výsledky:

U alely DRB1*04 byl shledán významný rozdíl alelických frekvencí mezi anti-MCV+ a anti-MCV- pacienty.

DRB1*04, $P = 0,045$, $OR = 2,74$

Porovnání ostatních alel neprokázalo signifikantní rozdíly alelických frekvencí ($P > 0,05$).

Poznámka: Protože alely DRB1*08 a DRB1*16 byly v souboru 81 pac. s RA zastoupeny s nízkou četností (4x), jsou příslušné výsledky statistické analýzy u těchto alel na hranici validity. Alelu DRB1*12, která byla v souboru zastoupena pouze jednou jsem ze statistického zpracování vyloučil vůbec.

5.3.4 Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek u vyšetřovaného souboru nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely

V návaznosti na předchozí analýzu, která prokázala statisticky významnou asociaci DRB1*04 alely s pozitivitou anti-CCP protilátek, jsem přikročil k porovnání výše hladin anti-CCP u nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely.

Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek u nemocných s přítomností a absencí DRB1*04 alely je uvedena v tabulce číslo 19.

Tabulka 19: Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek u nemocných s přítomností a absencí DRB1*04 alely

	anti-CCP+ DRB1*04+ (N=43)	anti-CCP+ DRB1*04- (N=38)
Průměr:	407,17	462,30
Medián:	221,00	270,75
Směr. odch.:	397,75	537,00
Minimum:	1,50	0,50
Maximum:	1 425,00	2 081,00
Max - Min:	1 423,50	2 080,50

Mezi nemocnými s přítomností a absencí DRB1*04 alely nebyl nepárovým t-testem s Welschovou korekcí prokázán signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-CCP ($P > 0,05$) protilátek.

5.3.5 Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek u vyšetřovaného souboru nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely

V návaznosti na předchozí analýzu, která prokázala statisticky významnou asociaci DRB1*04 alely s pozitivitou anti-MCV protilátek, jsem přikročil k porovnání výše hladin anti-MCV u nemocných s přítomností či absencí DRB1*04 alely.

Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek u nemocných s přítomností a absencí DRB1*04 alely je uvedena v tabulce číslo 20.

Tabulka 20: Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek u nemocných s přítomností a absencí DRB1*04 alely

	anti-MCV DRB1*04+ (N=43)	anti-MCV DRB1*04- (N=38)
Průměr:	77,85	60,22
Medián:	66,40	45,10
Směr. odch.:	59,90	62,94
Minimum:	9,20	0,20
Maximum:	291,30	309,40
Max - Min:	282,10	309,20

Mezi nemocnými s přítomností a absencí DRB1*04 alely nebyl nepárovým t-testem s Welschovou korekcí prokázán signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-MCV ($P > 0,05$) protilátek.

5.3.6 Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu

Porovnával jsem i výše hladin anti-CCP protilátek mezi homozygotním a heterozygotním DRB1*04 genotypem. Charakteristiku homozygotů a heterozygotů DRB1*04 s ohledem na výši hladiny anti-CCP protilátek uvádím v tabulce číslo 21.

Tabulka 21: Porovnání výše hladin anti-CCP protilátek u homozygotů a heterozygotů pro DRB1*04 alelu

	anti-CCP DRB1*04/DRB1*04 (N=12)	anti-CCP DRB1*04/wt (N=31)
Průměr:	326,93	438,23
Medián:	216,25	221,00
Směr. odch.:	295,21	426,91
Minimum:	54,50	1,50
Maximum:	979,00	1425,00
Max - Min:	924,50	1423,50

Mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu nebyl nepárovým t-testem s Welschovou korekcí prokázán signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-CCP ($P > 0,05$).

5.3.7 Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu

Porovnával jsem i výše anti-MCV hladin mezi homozygotním a heterozygotním DRB1*04 genotypem. Charakteristiku homozygotů a heterozygotů DRB1*04 s ohledem na výši hladiny anti-MCV protilátek uvádím v tabulce číslo 22.

Tabulka 22: Porovnání výše hladin anti-MCV protilátek u homozygotů a heterozygotů pro DRB1*04 alelu

	anti-MCV DRB1*04/ DRB1*04 (N=12)	anti-MCV DRB1*04/wt (N=31)
Průměr:	71,88	80,16
Medián:	64,05	66,50
Směr. odch.:	48,92	63,49
Minimum:	9,20	11,90
Maximum:	170,90	291,30
Max - Min:	161,70	279,40

Mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 nebyl nepárovým t-testem s Welschovou korekcí prokázán signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-MCV ($P > 0,05$).

6. DISKUZE

Revmatoidní artritida je polygenně podmíněné onemocnění. Nejvýznamnější podíl genetické predispozice připadá na geny hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy. Vazba některých forem HLA-DRB1 (HLA-DR4, DR1) genu s vnímavostí k RA je již delší dobu známa a byla opakovaně prokázána. Určité, s chorobou asociované, DRB1 alely kódují konzervovanou sekvenci pěti aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti HLA-DR beta řetězce, tzv. sdílený epitop (SE). Sdílený epitop představuje hlavní rizikový faktor těžších forem onemocnění, molekulární mechanismy, kterými ovlivňuje závažnost RA, však zůstávají neznámé. U kavkazské populace se SE považuje za primárně asociovaný s RA. Frekvence a převaha (predominance) jednotlivých SE kódujících alel se však liší v závislosti na sledovaném etniku a geografické lokalitě [20,24]. V severní Evropě je RA silně asociována s DRB1*0401, *0404, a *0408 alelami [153,154,155]. V Řecku, Španělsku a Itálii byla prokázána vazba s DRB1*0405, *0101 a *0102 variantami [156,157,25]. Prevalence DRB1*04 tak směrem k jihu Evropy vykazuje klesající tendenci [24]. Britské studie udávají variační šíři frekvence DRB1*04 alel 50 – 70 % u RA nemocných oproti 25–30 % u zdravé populace [153]. Německý výzkum rovněž prokázal zvýšenou frekvenci HLA-DR antigenů u RA pacientů vůči zdravým kontrolám (DR4 48 % vs. 28 %, DR1 32 % vs. 12 %) [158]. Maďarští autoři zaznamenali 31,3% frekvenci DRB1*04 v souboru RA nemocných proti 10,9 % u zdravých subjektů [159]. V italské populaci již převažuje vazba choroby s DRB1*01 alelami [24].

Ve shodě s výše uvedenými údaji potvrzují výsledky mé práce vazbu SE kódujících alel s chorobou u českých pacientů. Nejčastěji zastoupenou alelou v souboru nemocných byla dle předpokladů HLA-DRB1*04. Zaznamenal jsem signifikantně zvýšené frekvence DRB1*01 ($P < 0.01$), (10,5 % vs. 3 %, $OR = 3,75$) a DRB1*04 ($P < 0.01$), (34 % vs. 20,2 %, $OR = 2,03$) alel ve srovnání s kontrolní populací. Při interpretaci výsledků je však třeba uvážít, že pouze dvě DRB1*01 subvarianty (DRB1*0101, *0102) kódují sdílený epitop. Údaje týkající se této alely je tedy třeba posuzovat, vzhledem k SE, se značnou opatrností. Pro získání průkazných výsledků by bylo třeba typizovat na vyšší stupeň rozlišení. Významně snížená byla u pacientů s RA

frekvence DRB1*15 alely. ($P < 0.01$) ($OR = 0,39$). Vzhledem k tomuto nálezu je možné uvažovat o protektivní roli DRB1*15 u české populace. Tuto hypotézu by však bylo třeba potvrdit na větších souborech probandů. Novější srovnávací genotypizační data českých pacientů s RA nejsou bohužel k dispozici. Jediní, kdo v tuzemských podmínkách vyšetřovali asociaci HLA-DR antigenů s RA byli Dostál et al., kteří potvrdili sérologickou typizací vazbu HLA-DR4 s chorobou [16]. Jejich studie je však téměř 30 let stará a od té doby se změnila (kromě metody) diagnostická klasifikační kritéria pro RA. Lze tedy konstatovat, že má práce potvrdila asociaci DRB1*04 alel s RA u českých pacientů a je v obecném souhlasu s nálezy u regionálně blízkých populací. Zároveň potvrzuje poznatek, že frekvence jednotlivých DRB1 alel, podílejících se na vnímavosti k chorobě mezi jednotlivými kavkazskými subpopulacemi, kolísají. Pro zpřesnění výsledků tj. pro jednoznačné určení DRB1 variant kódujících sdílený epitop, by bylo třeba nositele DRB1*01, DRB1*04 a DRB1*10 alel otypizovat diagnostickými soupravami pro vyšší rozlišení.

Diferenciální laboratorní diagnostika RA se opírá o stanovení několika analytů. Obecnou screeningovou metodu pro systémová onemocnění pojiva představuje test na přítomnost antinukleárních protilátek (ANA). Protilátky ANA se vyskytují již před propuknutím a v prodromální fázi choroby, pozitivní výsledky však dávají vyšetření zdravých starších lidí, těhotných žen, pacientů s nádorovým onemocněním, chronickou infekcí a dalšími chorobami [176]. Ke stanovení přesné diagnózy jsou proto potřebná další vyšetření. ANA test není pro revmatoidní artritidu specifický, asociaci DRB1 alel s přítomností této protilátky jsem proto nepředpokládal. Sledování významnosti rozdílu alelických frekvencí jednotlivých DRB1 alel mezi soubory ANA pozitivních a ANA negativních pacientů sice ukázalo významný rozdíl ve frekvencích DRB1*16 alely ($P < 0.05$), vzhledem k nízké četnosti této alely ve studovaných souborech (4x) však výsledek nelze považovat za validní. V literatuře jsem našel jedinou studii zabývající se vztahem mezi HLA-DRB1 alelami a přítomností ANA. Španělští autoři, Garavito et al., zjistili asociaci HLA-DRB1*07 s ANA pozitivitou u skupiny kolumbijských mestických dětí s juvenilní RA [160]. Jedná se však o odlišný soubor pacientů, který neumožňuje srovnání s výsledky mé práce. Vzhledem k nedostatku studií na téma vazby HLA-DRB1 alel s ANA pozitivitou zůstává odpověď na tuto otázku otevřená a může být předmětem dalšího šetření.

Stanovení revmatoidního faktoru (RF) slouží především k odlišení revmatoidní artritidy (RA) od jiných forem artritid a dalších onemocnění, projevujících se bolestmi kloubů, záněty a únavností. Latex-fixační test (LFT) představuje základní screeningové vyšetření antiimunoglobulinových protilátek a detekuje především revmatoidní faktory třídy IgM. Asi 20 % klinicky zřejmých RA je v latex fixačním testu negativní (tzv. séronegativní RA).

Vysoce citlivé kvantitativní stanovení RF v jednotlivých izotypech IgA, IgG a IgM umožňuje metoda ELISA. Kvantita IgG-RF koreluje lépe s aktivitou RA než IgM RF, navíc pravděpodobně souvisí s patogenezí sekundární vaskulitidy a tedy s horší prognózou onemocnění. Nález IgA-RF může mít podobnou specifitu jako vysoké hladiny IgM RF a signalizuje pravděpodobnost vzniku závažnějších kloubních erozí. Genetická dispozice k sekreci revmatoidních faktorů je nepochybná. Literatura uvádí 15 - 30 % konkordanci u monozygotních dvojčat a zvýšený rodinný výskyt. Starší studie RA pacientů sice našly vztah mezi RF pozitivitou a nosičstvím alel kódujících sdílený epitop [161,155,162], pozdější práce však prokázaly, že nosičství těchto alel specificky souvisí s produkcí anti-CCP protilátek, dříve neznámých [35,36,37].

Porovnáním frekvence jednotlivých DRB1 alel mezi skupinami nemocných, RF LFT+ vs. RF LFT-, RF IgG+ vs. RF IgG-, RF IgA+ vs. RF IgA-, RF IgM+ vs. RF IgM-, jsem nezjistil žádné signifikantní rozdíly. Nezaznamenal jsem žádnou souvislost mezi nosičstvím DRB1 alel a přítomností revmatoidních faktorů, které jsem stanovil jak latex fixačním testem, tak metodou ELISA. Tyto nálezy jsou ve shodě s výsledky současných studií [163,164,36] .

Protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP) jsou relativně novým a vysoce specifickým markerem pro RA. Patří do skupiny ACPA protilátek, tj. protilátek proti citrulinovaným proteinům, které jsou nejčastěji prokazovány právě jako anti-CCP. Anti-CCP protilátky jsou převážně třídy IgG a mají pro RA výrazně vyšší specifitu než RF (anti-CCP 96 %, RF 63 %) při téměř shodné citlivosti (anti-CCP 80%, RF 79 %). Přítomnost anti-CCP je prokazována již na počátku choroby, potvrzena je asociace se závažností dalšího průběhu, především s progresí chrupavčitých a kostěných destrukcí detekovaných na RTG snímcích. Byla prokázána silná vazba mezi pozitivitou anti-CCP protilátek, a nosičstvím alel pro SE [35,36,132,165,166]. HLA-SE alely jsou vázány s ACPA pozitivní, ne však s ACPA

negativní RA [92,132,170]. Dvě studie navíc zjistily asociaci HLA-DRB1*03 (SE nekódující alely) s ACPA negativní RA [43,36], tuto vazbu však jiná práce nepotvrdila [37]. Ding et. al., dospěli k přesvědčivému závěru, že přítomnost ACPA protilátek zakládá samostatnou genetickou podskupinu RA [37]. Toto zjištění je v souladu s nově navrženým patogenetickým modelem, na kterém se podílejí geny nejméně dvou, možná i tří lokusů HLA třídy II. (HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP), a ve kterém je úloha adaptivní imunity (na HLA závislé) omezena převážně na ACPA pozitivní RA. Van der Helm et al. navíc prokázali, že alely kódující sdílený epitop předurčují spíše k produkci ACPA než k vývinu RA [170]. Tento fakt byl potvrzen v dalších studiích na severoamerických a švédských kohortách RA pacientů [167,92]. Asociace mezi nosičstvím SE alel a produkcí anti-CCP se naopak nepotvrdila u čínských pacientů s RA [168]. Vztah mezi SE alelami a produkcí anti-CCP - ACPA protilátek tak musí být posuzován v kontextu genetického pozadí, protože zvýšené dispozice k produkci ACPA dané nosičstvím alel sdíleného epitopu mohou být ovlivněny přítomností jiných, pouze pro určité etnikum specifických alel.

Ve své studii jsem zaznamenal významný rozdíl alelických frekvencí DRB1*04 alely mezi skupinami anti-CCP pozitivních a anti-CCP negativních pacientů s RA. Anti-CCP pozitivní nemocní vykazovali významně vyšší frekvenci této alely ($P < 0.05$). Z výpočtu poměru šancí (odds ratio) vyplývá, že pacienti nesoucí DRB1*04 alely mají 4,09 krát vyšší pravděpodobnost, že budou produkovat anti-CCP protilátky, a tedy i pravděpodobnost horší prognózy onemocnění. Tento výsledek je v obecném souladu s literárními údaji. Např. van Gaalen et al. udávají 3,3 krát vyšší pravděpodobnost zvýšené produkce anti-CCP u nositelů jedné či dvou alel sdíleného epitopu. Asociaci DRB1*03 alely s anti-CCP negativní RA jsem nepotvrdil. Při interpretaci tohoto výsledku však musí být zohledněno relativně nízké zastoupení DRB1*03 alely v souboru RA pacientů, který jsem vyšetřoval. Některé práce navíc studovaly asociaci mezi sérovou hladinou anti-CCP a nosičstvím sdíleného epitopu [163,169,170]. Byly prokázány signifikantně zvýšené hladiny anti-CCP u pacientů pozitivních pro SE ve srovnání s SE negativními nemocnými. Tento vztah jsem ve své práci nepotvrdil. Porovnáním výše hladin anti-CCP protilátek mezi skupinami RA pacientů s přítomností a absencí DRB1*04 jsem nezjistil signifikantní rozdíl. Tato skutečnost by mohla být zapříčiněna nehomogenitou souboru z hlediska medikace. Pokles anti-CCP protilátek po léčbě adalimumabem, etanerceptem a infliximabem zaznamenalo několik

studií [112,133,108,171]. Cuchacovich et al. zjistili, že basální hladiny anti-CCP protilátek korelují s klinickou odpovědí na léčbu adalimumabem [172]. Zprávu o farmakoterapeutickém vlivu na sérovou koncentraci autoprottilátek podaly i další práce [173,115]. V souboru, který jsem vyšetřoval bylo 47 pacientů léčeno některým z biologických preparátů. Vliv farmakoterapie lze pokládat za proměnnou, která může ovlivnit výsledky. Bylo by žádoucí zohlednit tento faktor při výběru souboru pacientů.

Další úkol mé práce spočíval v porovnání výše hladin anti-CCP protilátek produkovaných homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu. Mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu jsem nezaznamenal statisticky významný rozdíl ve výši hladin anti-CCP protilátek. Při interpretaci tohoto výsledku je třeba zohlednit již uváděnou výhradu týkající se možného vlivu farmakoterapie. Ani jiné studie zabývající se obdobnou problematikou však neprokázaly rozdíl v sérových hladinách anti-CCP mezi nosiči dvou alel SE a nosiči jedné SE alely [170,163].

Anti-MCV, protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu patří, podobně jako anti-CCP, do rodiny ACPA, skupiny protilátek proti citrulinovaným proteinům. Detekce anti-MCV je významnou součástí diagnostiky RA, zvláště u pacientů s negativním nálezem RF a anti-CCP. Výše protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu u pacientů s RA silně koreluje s ukazatelem aktivity choroby dle skóre DAS. Průkaz anti-MCV protilátek je důležitým kritériem farmakologické rozvahy a znamená významné zpřesnění diagnostiky a prognózy onemocnění.

Ve vyšetřovaném souboru nemocných s RA jsem zaznamenal významný rozdíl alelických frekvencí DRB1*04 alely mezi skupinami anti-MCV pozitivních a anti-MCV negativních pacientů. Nemocní s pozitivitou anti-MCV protilátek vykazovali významně vyšší frekvenci této alely ($P < 0.05$). Z výpočtu poměru šancí (odds ratio) vyplývá, že pacienti nesoucí DRB1*04 alely mají 2,74 krát vyšší pravděpodobnost, že budou produkovat anti-MCV než pacienti s absencí této alely. Tento nálezn je v souladu s výsledky jiných studií [174,175].

Dále jsem porovnával, stejně jako u anti-CCP protilátek, výši hladin anti-MCV protilátek mezi skupinami RA pacientů s přítomností a absencí DRB1*04 alely. Nezjistil jsem signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-MCV protilátek. Při studiu

literárních pramenů jsem nenalezl práce, s nimiž bych mohl tento výsledek konfrontovat. Sérové koncentrace anti-MCV protilátek mohou být, podobně jako u ostatních autoprotilátek, ovlivněny farmakoterapií [135]. Podrobnější studie, zabývající se touto problematikou však zatím nejsou k dispozici. Porovnával jsem též homozygotní a heterozygotní genotypy DRB1*04 alely s ohledem na výši hladin anti-MCV protilátek. Ani v tomto případě jsem nezjistil významný rozdíl ve výši hladin anti-MCV mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu.

7. ZÁVĚR

Předkládaná práce prezentuje výsledky studia sledujícího závislost mezi nosičstvím alel DRB1 genu a přítomností klinicky nejvýznamnějších autoprotilátek u RA. U 81 pacientů s RA, 72 žen a 9 mužů, jsem stanovil prevalence autoprotilátek (anti-CCP, anti-MCV, RF, ANA) a provedl HLA typizaci II. třídy metodou SSP low resolution. V úvodu práce byly vytyčeny cíle a stanoveny hypotézy:

Cíl 1: U souboru nemocných s revmatoidní artritidou stanovit prevalence autoprotilátek (anti-CCP, anti-MCV, RF, ANA) a definovat skupiny nemocných dle přítomnosti sledovaných autoprotilátek.

Cíl 2: U souboru pacientů s RA provést HLA typizaci a potvrdit porovnáním se skupinou zdravých kontrol předpokládané asociace HLA-DRB1 alel s chorobou. U alel DRB1*01, DRB1*04 a DRB1*15 jsem shledal významný rozdíl alelických frekvencí mezi pacienty a RA a zdravou populací.

Hypotéza 1 byla potvrzena. Soubor pacientů s revmatoidní artritidou vykazuje odlišnou distribuci alel DRB1 genu v porovnání se souborem zdravých kontrol.

Cíl 3: Zjistit, zda existuje závislost mezi nosičstvím určitých HLA-DRB1 alel a přítomností autoprotilátek. U alely DRB1*04 jsem shledal významný rozdíl alelických frekvencí mezi anti-CCP+ a anti-CCP- pacienty. U alely DRB1*04 jsem shledal významný rozdíl alelických frekvencí mezi anti-MCV+ a anti-MCV- pacienty.

*Hypotéza 2 byla potvrzena. Pacienti s pozitivním nálezem anti-CCP a anti-MCV protilátek vykazují signifikantně vyšší frekvence DRB1*04 alely v porovnání s pacienty anti-CCP a anti-MCV negativními.*

*Hypotéza 3 byla potvrzena. Pacienti s pozitivním nálezem RF, stanoveným jak LFT, tak metodou ELISA nevykazují signifikantně vyšší frekvence DRB1*04 alely v porovnání s pacienty RF negativními.*

Cíl 4: Porovnat výši hladin anti-CCP a anti-MCV autoprotilátek u pacientů, kteří nesou a kteří nenesou DRB1*04 alelu a rovněž mezi homozygoty a heterozygoty pro

DRB1*04 alelu. Mezi nemocnými s přítomností a absencí DRB1*04 alely jsem neprokázal signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek. Mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu jsem neprokázal signifikantní rozdíl ve výši hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek.

Hypotéza 4 byla zamítnuta. Nositelé DRB1*04 alely nevykazují vyšší hladiny anti-CCP a anti-MCV protilátek v porovnání s pacienty s absencí této alely.

Hypotéza 5 byla zamítnuta. Homozygotní genotyp pro DRB1*04 alelu není asociován s vyšší produkcí anti-CCP a anti-MCV protilátek v porovnání s heterozygotním genotypem.

Výsledky HLA typizace II. třídy potvrdily asociaci HLA-DRB1*04 alely s RA v české populaci. Závěry získané na základě studia závislosti mezi nosičstvím DRB1 alel a přítomností klinicky nejvýznamnějších protilátek u pacientů s RA souhlasí s prokázanou asociací mezi nosičstvím alel pro SE a produkcí ACPA protilátek. Porovnáním výše hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek mezi skupinami RA pacientů s přítomností a absencí DRB1*04 alely jsem, v kontrastu k publikovaným údajům, nezjistil signifikantní rozdíl. Stejně tak jsem neprokázal významný rozdíl ve výši hladin anti-CCP a anti-MCV protilátek mezi homozygoty a heterozygoty pro DRB1*04 alelu.

Pro zpřesnění studie a získání validnějších výsledků by bylo třeba:

1. Zvětšit studovaný soubor pacientů.
2. Sledovat přítomnost a výši hladin autoprottilátek longitudinálně.
3. Provést HLA typizaci s vyšším rozlišením, určit jednotlivé subtypy alel kódujících SE (DRB1*01, DRB1*04, DRB1*10).
4. Definovat a vybrat homogenní soubory pacientů s ohledem na medikamentózní léčbu.

Stanovení rizikových DRB1 alel může pomoci při detekci osob ohrožených RA, vazba mezi HLA-DRB1 alelami kódujícími sdílený epitop a produkcí ACPA protilátek může predikovat budoucí vývoj a závažnost onemocnění.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hořejší, V., Bartůňková J.: Základy imunologie, 3.vyd., Triton, Praha 2005.
2. Pavelka, K., Rovenský, J. a kol.: Klinická revmatologie, Galén, Praha 2003.
3. Wilder, R.L.: Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol Suppl.* 1996; 44: 10-12.
4. Bodmer, W.F.: The HLA system: structure and function. *J Clin Pathol.* 1987; 40: 948-58.
5. Buc, M.: Imunológia, Veda, Bratislava 2001.
6. Shankarkumar, U.: The human leukocyte antigen (HLA) system. *Int J Hum Genet.* 2004; 4: 91-103.
7. HLA laboratoř. Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň. [Online] [20. 6. 2009] <http://www.fnplzen.cz/data/prac/Lochotin/hoo/odborna-verejnost/metody/6-hla.html>.
8. Gerlach, J.A.: Human lymphocyte antigen molecular typing: how to identify the 1250+alleles out there. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 281-84.
9. Fortina, P., Delgrosso, K., Sakazume, T., Santacroce, R., Moutereau, S., Su, H.J., Mackenzie, S., Surfy, S.: Simple two-color array-based approach for mutation detection. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 884-894.
10. Holdsworth, R., Hurley, C.K., Marsh, S.G.E., Lau, M., Noreen, H.J, Kempenich, J.H., Setterholm, M., Maiers, M.: The HLA Dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens. *Tissue Antigens.* 2009; 73: 95-170.
11. Harney, S.M.J., Newton, J.L., Wordsworth, B.P.: Molecular genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol.* 2003; 3: 280-85.

12. Němec, P.: Imunogenetické aspekty v etiopatogenezi revmatoidní artritidy. Role promotorového polymorfismu-308G/A genu pro tumor nekrotizující faktor alfa. Čes. Revmatologie. 2007; 15: 25-33.
13. Newton, J.L., Harney, S.M.J., Wordsworth, B.P., Brown, M.A.: A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. Genes and Immunity. 2004; 5: 151–57.
14. Gregersen, P.K.: Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. Arthritis Res. 1999;1: 37-44.
15. Stastny, P.: Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 1978; 298: 869-71.
16. Dostál, C., Ivašková, E., Macurová, H., Hána, I., Šusta, A., Zvárová, J.: HLA antigens of A,B,C and DR loci in adult rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1981; 8: 864-66.
17. Seldin, M.F., Amos, C.I., Ward, R., Gregersen, P.K.: The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999; 42: 1071-79.
18. Vencovský, J.: Autoimunitní systémová onemocnění, Triton, Praha 1998.
19. Novota, P., Cerna, M., Kolostovova, K., Cejkova, P., Zdarsky, E., Novakova, D., Kucera, P., Novak, J., Andel, M.: Diabetes mellitus in adults: association of HLA-DRB1 and DQB1 diabetes risk alleles with GADab presence and C-peptide secretion. Imun. Lett. 2004; 95: 229-32.
20. Ollier, W., Thomson, W.: Population genetics of rheumatoid arthritis. Rheum Dic Clin N Am. 1992; 18: 741-59.
21. Mody, G.M., Hammond, M.G.: Differences in HLA-DR association with rheumatoid arthritis among migrant Indian communities in South Africa. Br J Rheumatol. 1994; 33: 425-27.
22. Sattar, M.A., Al-Saffar, M., Guindi, R.T., Sugathan, T.N., Behbehani, K.: Association between HLA-DR antigens and rheumatoid arthritis in Arabs. Ann Rheum Dis. 1990; 49: 147-49.

23. Nelson, J.L., Boyer, G., Templin, D., Lanier, A., Barrington, R., Nisperos, B., Smith, A., Mickelson, E., Hansen, J.A.: HLA antigens and Tlingit Indians with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1992; 40: 57-63.
24. Balsa, A., Barrera, P., Westhovens, R., Alves, H., Maenaut, K., Pascual-Salcedo, D., Cornélis, F., Bardin, T., Riente, L., Radstake, T.R.D.J., de Almeida, G., Lepage, V., Stravopoulos, C., Spaepen, M., Lopes-Vaz, A., Charón, D., Martinez, M., Prudhomme, J. F., Migliorini, P., Fritz, P.: Clinical and immunogenetic characteristics of European multicase rheumatoid arthritis families. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60: 573-76.
25. Salvarani, C., Macchioni, P., Mantovani, W., Rossi, F., Veneziani, M., Boiardi, L., Lodi, L., Portioli, I.: Extraarticular manifestation of rheumatoid arthritis and HLA antigens in northern Italy. *J Rheumatol*. 1992; 19: 242-46.
26. Gao, X., Gazit, E., Livneh, A., Stastny, P.: Rheumatoid arthritis in Israeli Jews: shared sequences in the third hypervariable region of DRB1 alleles are associated with susceptibility. *J Rheumatol*. 1991; 18: 801-03.
27. Gregersen, P.K., Silver, J., Winchester, R.J.: The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987; 30: 1205-13.
28. Firestein, G.S., Panai, G.S., Wollheim, F.A.: Rheumatoid arthritis, Oxford university press, 2006.
29. Milicic, A., Lee, D., Brown, M.A., Darke, C., Wordsworth, B.P.: HLA-DR/DQ haplotype in rheumatoid arthritis: novel allelic associations in UK Caucasians. *J Rheumatol*. 2002; 29: 1821-26.
30. Revirion, D., Perdriger, A., Toussiot, E., Wendling, D., Balandraud, N., Guis, S., Semana, G., Tiberghien, P., Mercier, P., Roudier, J.: Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 535-40.
31. Němec, P.: Imunogenetické aspekty v etiopatogenezi revmatoidní artritidy. Role polymorfismu genu pro tumor nekrotizující faktor α , Doktorská dizertační práce, Brno 2006.

32. Rowley, M.J., Stockman, A., Brand, C.A., Tait, B.A, Rowley, G.R, Sherritt, M.A., Mackay, I.R., Muirden, K.D., Bernard, C.C.A.: The effect of HLA-DRB1 disease susceptibility markers on the expression of RA. *Scand J Rheumatol.* 1997; 26: 448-55.
33. du Montcel, S.T., Michou, L., Petit-Teixeira, E., Osorio, J., Lemaire, I., Lasbleiz, S., Pierlot, C., Quillet, P., Bardin, T., Prum, B., Cornelis, F., Clerget-Darpoux, F.: New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1063-68.
34. Gourraud, P.A., Boyer, J.F., Barnetche, T., Abbal, M., Cambon-Thomsen, A., Cantagrel, A., Constantin, A.: A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for rheumatoid arthritis structural severity. *Arthritis Rheum.* 2006; 2: 593-99.
35. van Gaalen, F.A., van Aken, J., Huizinga, T.W., Schreuder, G.M., Breedveld, F.C., Zanelli, E., van Venrooij, W.J., Verweij, C.L., Toes, R.E., de Vries, R.R.: Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPS) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2113–21.
36. Irigoyen, P., Lee, A.T., Wener, M.H., Li, W., Kern, M., Batliwalla, F., Lum, R.F., Massarotti, E., Weisman, M., Bombardier, C., Remmers, E.F., Kastner, D.L., Seldin, M.F., Criswell, L.A., Gregersen, P.K.: Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the Sharp epitope alleles. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3813–18.
37. Ding, B., Padyukov, L., Lundstrum, E., Seielstad, M., Plenge, R.M., Oksenberg, J.R., Gregersen, P.K., Alfredsson, L., Klareskog, L.: Different patterns of associations with ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis in the extended MHC region. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 30–38.
38. Lee, A.T., Li, W., Liew, A., Bombardier, C., Weisman, M., Massarotti, E.M., Kent, J., Wolfe, F., Begovich, A. B., Gregersen, P. K.: The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.* 2005; 6: 129–33.
39. Johansson, M., Arlestig, L., Hallmans, G., Rantapaa-Dahlqvist, S.: PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly

- predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res Ther.* 2005; 8: R19.
40. Kokkonen, H., Johansson, M., Innala, L., Jidell, E., Rantapaa-Dahlqvist, S.: The PTPN22 1858C/T polymorphism is associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-positive early rheumatoid arthritis in northern sweden. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: R56.
41. Feitsma, A.L., Toes, R.E., Begovich, A.B., Chokkalingam, A.P., de Vries R.R., Huizinga, T. W. J., van der Helm-van Mil A.H.M.: Risk of progression from undifferentiated arthritis to rheumatoid arthritis: the effect of the PTPN22 1858T-allele in anticitrullinated peptide antibody positive patients. *Rheumatology.* 2007; 46: 1092-95.
42. Orozco, G., Pascual-Salcedo, D., López-Nevot, M.A., Cobo T., Cabezón, A., Martín-Mola, E., Balsa, A., Martín, J.: Auto-antibodies, HLA and PTPN22: susceptibility markers for rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2008; 47;138-41.
43. Verpoort, K.N., van Gaalen, F.A., van der Helm-van Mil, A.H., Schreuder, G.M., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W., de Vries, R.R., Toes, R.E.: Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3058-62.
44. Gottenberg, J.E., Busson, M., Loiseau, P., Cohen-Solal, J., Lepage, V., Charron, D., Mariette, X., Sibilla, J.: In primary Sjögren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with antibody production and spreading of the immune response. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 2240-45.
45. Falkner, D., Wilson, J., Fertig, N., Clawson, K., Medsger, T.A., Morel, P.A.: Studies of HLA-DR and DQ alleles in systemic sclerosis patients with autoantibodies to RNA polymerases and U3-RNP (fibrillarin). *J Rheumatol.* 2000; 27: 1196-202.
46. Kulmala, P., Savola, K., Reijonen, H., Veijola, R., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Tuomilehto-Wolf, E., Ilonen, J., Tuomilehto, J., Akerblom, H.K., Knip, M.: Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes.* 2000; 49: 48-58.

47. van der Horst-Bruinsma I.E., Visser, H., Hazes, J.M., Breedveld F.C., Verduyn, W., Schreuder, G.M., de Vries, R.R., Zanesli, E.: HLA-DQ-associated predisposition to and dominant HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 1999; 60: 152-58.
48. Cranney, A., Goldstein, R., Pham, B., Newark, M.M., Karsh, J.: A measure of limited joint motion and deformity correlates with HLA-DRB1 and DQB1 alleles in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58: 703-08.
49. Mulcahy, B., Waldron-Lynch, F., McDermott, M.F., Adams, C., Amos, C.I., Zhu, D.K., Ward, R.H., Clegg, D.O., Shanahan, F., Molloy, M.G., O'Gara, F.: Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 676-83.
50. Ota, M., Katsuyama, Y., Kimura, A., Tsuchiya, K., Kondo, M., Naruse, T., Mizuki, N., Itoh, K., Sasazuki, T., Inoko, H.: A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics.* 2001; 71: 263-70.
51. Jawaheer, D., Li, W., Graham, R.R., Chen, W., Damle, A., Xiao, X., Monteiro, J., Khalili, H., Lee, A., Lundsten, R., Begovich, A., Bugawan, T., Erlich, H., Elder, J.T., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Amos, C.I., Behrens, T.W., Gregersen, P.K.: Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 585-94.
52. Newton, J.L., Harney, S.M., Timms, A.E., Sims, A.M., Rockett, K., Darke, C., Wordsworth, B.P., Kwiatkowski, D., Brown, M.A.: Dissection of class III major histocompatibility complex haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2122-29.
53. Lee, H.S., Lee, A.T., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Amos, C.I., Carulli, J.P., Navarette, C., Remmers, E.F., Kastner, D.L., Plenge, R.M., Li, W., Gregersen, P.K.: Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Mol Med.* 2008; 14: 293-300.

54. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature*. 2007; 447: 661-78.
55. Plenge, R.M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A.T., Remmers, E.F., Ding, B., Liew, A., Khalili, H., Chandrasekaran, A., Davies, L.R., Li, W., Tan, A.K., Bonnard, C., Ong, R.T., Thalamuthu, A., Pettersson, S., Liu, C., Tian, C., Chen, W.V., Carulli, J.P., Beckman, E.M., Altshuler, D., Alfredsson, L., Criswell, L.A., Amos, C.I., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Klareskog, L., Gregersen P.K.: TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis-a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1199-209.
56. Begovich, A.B., Carlton, V.E., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M., Conn, M.T., Chang, M., Chang, S.Y., Saiki, R.K., Catanese, J.J., Leong, D.U., Garcia, V.E., McAllister, L.B., Jeffery, D.A., Lee, A.T., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Amos, C.I., Sninsky, J.J., Gregersen, P.K.: A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004; 75: 330-37.
57. Gregersen, P.K., Lee, H.S., Batliwalla, F., Begovich, A.B.: PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol*. 2006; 18: 214-23.
58. Kurreeman, F.A., Padyukov, L., Marques, R.B., Schrodi, S.J., Seddighzadeh, M., Stoeken-Rijsbergen, G., van der Helm-van Mil, A.H., Allaart, C.F., Verduyn, W., Houwing-Duistermaat, J., Alfredsson, L., Begovich, A.B., Klareskog, L., Huizinga, T.W., Toes, R.E.: A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med*. 2007; 4: e278.
59. Barton, A., Thomson, W., Ke, X., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Gibbons, L., Plant, D.; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wilson, A.G., Marinou, I., Morgan, A., Emery, P.; YEAR consortium, Steer, S., Hocking, L., Reid, D.M., Wordsworth, P., Harrison, P., Worthington, J.: Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Mol Genet*. 2008; 17: 2274-79.
60. Coenen, M.J.H., Gregersen, P.K.: Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape, *Genes and Immunity*. 2009; 10: 101-11.

61. Levy, D.E., Darnell Jr, J.E.: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev.* 2002; 3: 651-662.
62. Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., de Bakker, P.I., Le, J.M., Lee, H.S., Batliwalla, F., Li, W., Masters, S.L., Booty, M.G., Carulli, J.P., Padyukov, L., Alfredsson, L., Klareskog, L., Chen, W.V., Amos, C.I., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Gregersen, P.K.: STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J med.* 2007; 357: 977-86.
63. Lee, H.S., Remmers, E.F., Le, J.M., Kastner, D.L., Bae, S.C., Gregersen, P.K.: Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Mol Med.* 2007; 13: 455-60.
64. Korman, B.D., Alba, M.I., Le, J.M., Alevizos, I., Smith, J.A., Nikolov, N.P., Kastner, D.L., Remmers, E.F., Illei, G.G.: Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes immun.* 2008; 9: 267-70.
65. Plenge, R.M., Cotsapas, C., Davies, L., Price, A.L., de Bakker, P.I., Maller, J., Pe'er, I., Burt, N.P., Blumenstiel, B., DeFelice, M., Parkin, M., Barry, R., Winslow, W., Healy, C., Graham, R.R., Neale, B.M., Izmailova, E., Roubenoff, R., Parker, A.N., Glass, R., Karlson, E.W., Maher, N., Hafler, D.A., Lee, D.M., Seldin, M.F., Remmers, E.F., Lee, A.T., Padyukov, L., Alfredsson, L., Coby, J., Weinblatt, M.E., Gabriel, S.B., Purcell, S., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Shadick, N.A., Daly, M.J., Altshuler, D.: Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007; 39: 1477-82.
66. Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Yamamoto, K.: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003; 34: 395-402.

67. Todd, J.A., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S.F., Payne, F., Lowe, C.E., Szeszko, J.S., Hafler, J.P., Zeitels, L., Yang, J.H., Vella, A., Nutland, S., Stevens, H.E., Schuilenburg, H., Coleman, G., Maisuria, M., Meadows, W., Smink, L.J., Healy, B., Burren, O.S., Lam, A.A., Ovington, N.R., Allen, J., Adlem, E., Leung, H.T., Wallace, C., Howson, J.M., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviște, C.; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds, M.J., Heward, J.M., Gough, S.C.; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger, D.B., Wicker, L.S., Clayton, D.G.: Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *NatGenet.* 2007; 39: 857-64.
68. Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L.C., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M.J., Pullinger, C.R., Kane, J.P., Saccone, S., Worthington, J., Bruce, I., Kwok, P.Y., Menter, A., Krueger, J., Barton, A., Saccone, N.L., Bowcock, A.M.: A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease Loci. *PloS. Genet.* 2008; 4: e1000041.
69. Zhernakova, A., Alizadeh, B.Z., Bevoja, M., van Leeuwen, M.A., Coenen, M.J., Franke, B., Franke, L., Posthumus, M.D., van Heel, D.A., van der Steege, G., Radstake, T.R., Barrera, P., Roep, B.O., Koeleman, B.P., Wijmenga, C.: Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 1284-88.
70. Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D.: Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte fiction. *Nature.* 2000; 408 :57-63.
71. Strietholt, S., Maurer, B., Peters, M. A., Pap, T., Gay, S.: Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10 : 219.

72. Sedivy, J.M., Banumathy, G., Adams, P.D.: Aging by epigenetics - a consequence of chromatin damage? *Exp Cell Res.* 2008, 314: 1909-17.
73. Yung, R.L., Julius, A.: Epigenetics, aging, and autoimmunity. *Autoimmunity.* 2008, 41: 329-335.
74. He, L., Hannon, G.J.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5: 522-31.
75. Rajewsky, N., Socci, N.D.: Computational identification of microRNA targets, *Dev. Biol.* 2004; 267: 529-35.
76. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., Baltimore, D.: Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:111-22.
77. Luo, X., Tsai, L.M., Shen, N., Yu, D.: Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: i30-i36.
78. Furer, V. , Greenberg, J. D., Mukundan, A., Abramson, S. B., Pillinger, M. H.: The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin. Immunol.* 2010, 136: 1-15.
79. Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., Chan, E.K.: Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10: R101.
80. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.Y.: Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell. Res.* 2008; 18: 997–1006.
81. Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., Nakamura, T.: Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R86.

82. Dostál, C., Vojtěchovský, K., Hána, I., Zvárová, J.: Protilátky proti kapsidovému (VCA) a nukleárnímu (EBNA) antigenu viru Epstein-Barrové u nemocných s revmatoidní artritidou. *Čas Lék Čes.* 1987; 126: 237-40.
83. Kouri, T., Peterson, J., Rhodes, G., Aho, K., Palosuo, T., Heliövaara, M., Isomäki, H., von Essen, R., Vaughan, J.H.: Antibodies to synthetic peptides from Epstein- Barr nuclear antigen-1 in sera of patients with early rheumatoid arthritis and preillness sera. *J Rheumatol.* 1990; 17: 1442-9.
84. Hazes, J. M. W. , Dijkmans, B. A. C., Vandenbroucke, J. P., De Vries, R. R. P., Cats, A: Pregnancy and the risk of developing rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis.* 1990, 33: 1770-75.
85. Heliövaara, M., Aho, K., Reunanen, A., Knekt, P., Aromaa, A.: Parity and risk of rheumatoid arthritis in Finnish women. *Br J Rheumatol.* 1995; 34: 625-28.
86. Silman, A.J., Kay, A., Brennan, P.: Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 152-55.
87. Brennan, P., Silman, A.: Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:808-13.
88. James, W.H.: Further evidence that low androgen values are a cause of rheumatoid arthritis: the response of rheumatoid arthritis to seriously stressful life events. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56: 566.
89. Masi, A.T., Chatterton, R.T., Aldag, J.C.: Perturbations of hypothalamic-pituitary-gonadal axis and adrenal androgen functions in rheumatoid arthritis: an odyssey of hormonal relationships to the disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 876: 53-62.
90. Pladevall-Vila, M., Delclos G. L., Varas C., Guyer, H., Bruges-Tarradellas, J., Anglada-Arisa, A.: Controversy of Oral Contraceptives and Risk of Rheumatoid Arthritis: Meta-analysis of Conflicting Studies and Review of Conflicting Meta-analyses with Special Emphasis on Analysis of Heterogeneity. *Am J Epidemiol.* 1996; 144: 1-14.

91. van der Helm-van Mil, A.H., Verpoort, K.N., le Cessie, S., Huizinga, T.W., de Vries, R.R., Toes, R.E.: The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 425-32.
92. Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L., Alfredsson, L.: A new model for an etiology of rheumatoid arthritis. Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 38-46.
93. Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredson, L., Klareskog, L.: A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3085-92.
94. Vossenaar, E.R., Radstake, T.R., van der Heijden, A., van Mansum, M.A., Dieteren, C., de Rooij, D.J., Barrera, P., Zendman, A.J., van Venrooij, W.J.: Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum. Dis* 2004; 63: 373-81.
95. Symmons, D.P., Bankhaed, C.R., Harrison, B.J.: Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-bases incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* 1997;40: 1955-61.
96. Silman, A.J., Hochberg, M.C.: *Epidemiology of the rheumatic disease.* 2nd edn., Oxford University Press, Oxford 2001.
97. Cvetkovic, J.T., Wallberg-Jonsson, S., Stegmayr, B., Rantapaa-Dahlqvist, S., Lefvert, A.K.: Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNFalpha, IL-1 beta and IL-1Ra genes. *J Rheumatol.* 2002; 29: 212-9.
98. Ospelt, C., Neidhart, M., Gay, R.E., Gay, S.: Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2004; 9: 2323-24.
99. Krejsek, J., Kopecký, O.: *Klinická imunologie*, Nucleus HK, Hradec Králové, 2004.

100. Kaufmann, S. H. E.: Heat-shock proteins: a link between rheumatoid arthritis and infection?. *Curr Opin Revmatol* 1990; 2: 420.
101. Weyand, C.M.: New insights into the patogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2000; 39(suppl.1): 3-8.
102. Firestein, G.S.: The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytosine networks in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2004; 114: 471-74.
103. Klimiuk, P.A., Yang, H., Goronzy, J.J., Weyand, C.M.: Production of cytokines and metallproteinases in synovitis is T cell dependent. *Clin. Immunol* 1999; 90: 65-78.
104. Vassalli, P.: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10: 411-52
105. Breutigam, W., von Rad, M.: *Psychosomatische medizin*, Thieme, Stuttgart 1998.
106. Bobbio-Pallavicini, F., Alpini, C., Caporali, R., Avalue, S., Bugatti, S., Montecucco, C.: Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6: R264-72.
107. Nissinen, R., Leirisalo-Repo, M., Peltomaa, R., Palosuo, T., Vaarala, O.: Cytokine and chemokine receptor profile of peripheral blood mononuclear cells during treatment with infliximab in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 681-87.
108. Alessandri, C., Bombardieri, M., Papa, N., Cinquini, M., Magrini, L., Tincani, A., Valesini, G.: Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 1218-21.
109. De Rycke, L., Verhelst, X., Kruithof, E., Van den Bosch, F., Hoffman, I.E., Veys, E.M., De Keyser, F.: Rheumatoid factor, but not anti-citrullinated protein antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004; 64: 299-302.
110. Caramaschi, P., Biasi, D., Tonolli, E., Pieropan, S., Martinelli, N., Carletto, A., Volpe, A., Bambara, L.M.: Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients

- affected by rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment. *Rheumatol Int.* 2005; 26: 58-62.
111. Kolarz, B., Mejdán, M., Dryglewska, M., Darmochwał-Kolarz, D.: Antibodies against cyclic citrullinated peptide don't decrease after 6 months of infliximab treatment in refractory rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2010; May 15 (in press).
112. Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Dell'Acqua, D., de Portu, S., Cecchini, G., Cruini, C., Carrabba, M., Meroni, P.L.: Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8: R3.
113. Braun-Moscovici, Y., Markovits, D., Zinder, O., Schapira, D., Rozin, A., Ehrenburg, M., Dain, L., Hoffer, E., Nahir, A.M., Balbir-Gurman, A.: Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2006; 33: 497-500.
114. Mikuls, T.R., O'Dell, J.R., Stoner, J.A., Parrish, L.A., Arend, W.P., Norris, J.M., Holers, V.M.: Association of rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3776-82.
115. Rönnelid, J., Wick, M.C., Lampa, J., Lindblad, S., Nordmark, B., Klareskog, L., van Vollenhoven, R.F.: Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 1744-49.
116. Vencovský J.: Jak pomáhá vyšetřování autoprotilátek v diagnostice a hodnocení autoimunitních revmatických chorob? *Vnitř Lék.* 2006; 52: 7-8.
117. Hrdá, P., Štercl, I.: Vyšetření autoprotilátek-současné možnosti. *Interní medicína pro praxi.* 2003; 8: 410-413.
118. Egerer, K., Feist, E., Burmester, G.R.: The serological diagnosis of rheumatoid arthritis, antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106: 159-63.

119. Tan, E.M.: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol.* 1982; 33: 167-240.
120. Smolen, J.S.: Autoantibodies in rheumatoid arthritis. In: van Venrooij, W.J, Maini (ed.): *Manual of Biological Markers of Disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1996; sekce C1.1: 1-18.
121. van Venrooij, W.J., Zendman, A.J., Pruijn, G.J.: Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2006; 6: 37-41.
122. Bang, H., Egerer, K., Gauliard, A., L  thke, K., Rudolph, P.E., Fredenhagen, G., Berg, W., Feist, E., Burmester, G.R.: Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 2503-11.
123. Vossenaar, E.R., Radstake, T.R., van der Heijden, A., van Mansum, M.A., Dieteren, C., de Rooij, D.J., Barrera, P., Zendman, A.J., van Venrooij, W.J.: Expression and activity of citrullinatin peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 373-81
124. Vencovsk  , J.: Laboratorní diagnostika u syst  mov  ch revmatick  ch onemocn  n  . In: Zima, T. (ed): *Laboratorní diagnostika*, Gal  n, Praha 2002; 248-58.
125. Matthey, D.L., Dawes, P.T., Clarke, S., Fisher, J., Brownfield, A., Thomson, W., Hajeer, A.H., Ollier, W.E.: Relationship among HLA-DRB1 shared epitope, smoking and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Neum.* 2002; 47: 403-07.
126. Schellekens, G.A., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., van de Putte, L.B., van Venrooij, W.J.: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998; 101: 273-81.
127. Vencovsk  , J.,   edov  , L., R   i  kov  ,   .: Protilátky proti citrulinovan  m protein  m u revmatoidní artritidy. *  es. Revmatol.* 2005; 4: 164-175.
128. van Venrooij, W.J., van Beers, J.J., Pruijn, G.J.: Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143: 268-85.

129. Bongi, S.M., Manetti, R., Melchiorre, D., Turchini, S., Boccaccini, P., Vanni, L., Maggi, E.: Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are highly associated with severe bone lesions in rheumatoid arthritis anti-CCP and bone damage in RA. *Autoimmunity*. 2004; 37: 495-501.
130. Machold, K.P., Stamm, T.A., Nell, V.P., Pflugbeil, S., Aletaha, D., Steiner, G., Uffmann, M., Smolen, J.S.: Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2007; 46: 342-49.
131. van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E.W., Toes, R.E., Huizinga, T.W., van Laar, J.M.: Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 53-60.
132. Huizinga, T.W., Amos, C.I., van der Helm-van Mil, A.H., Chen, W., van Gaalen, F.A., Jawaheer, D., Schreuder, G.M., Wener, M., Breedveld, F.C., Ahmad, N., Lum, R.F., de Vries, R.R., Gregersen, P.K., Toes, R.E., Criswell, L.A.: Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB-1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 3433-38.
133. Bizzaro, N., Tamponi, M.: Diagnostic accuracy of immunoassays for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2008; 34:16-20.
134. De Vries, R.R., Huizinga, T.W., Toes, R.E.: Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive. *J. Autoimmun*. 2005; 25: 21-25.
135. Roland, P.N., Mignot, S.G., Bruns, A., Hurtado, M., Palato, E., Havem, G., Dieudé, P., Meyer, O., Martin, S.C.: Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10: R142.
136. Mathsson, L., Mullazehi, M., Wick, M.C., Sjöberg, O., van Vollenhoven, R., Klareskog, L., Rönnelid, J.: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: Higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum*. 2007; 58: 36-45.

137. Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., Markovitz, D.M.: Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol.* 2003; 5:59-63.
138. Beneš, P., Šmarda, J.: Vimentin: příklad aktivního zapojení složky cytoskeletu do regulačních procesů buňky. *Biologické listy.* 2004; 4: 265-78.
139. El-Gabalawy, H.S., Wilkins, J.A.: Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6: 86-9.
140. Després, N., Boire, G., Lopez-Longo, F.J., Ménard, H.A.: The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994; 21: 1027-33.
141. Ménard, H.A., Lapointe, E., Rochdi, M.D., Zhou, Z.J.: Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res.* 2000; 2: 429-32.
142. Goldbach-Mansky, R., Lee, J., McCoy, A., Hoxworth, J., Yarboro, C., Smolen, J.S., Steiner, G., Rosen, A., Zhang, C., Ménard, H.A., Zhou, Z.J., Palosuo, T., Van Venrooij, W.J., Wilder, R.L., Klippel, J.H., Schumacher, H.R. Jr, El-Gabalawy, H.S.: Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res.* 2000; 2: 236-43.
143. Boire, G., Cossette, P., de Brum-Fernandes, A.J., Liang, P., Niyonsenga, T., Zhou, Z.J., Carrier, N., Daniel, C., Ménard, H.A.: Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic citrullinated peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R592-603.
144. Vittecoq, O., Jouen-Beades, F., Krzanowska, K., Bichon-Tauvel, I., Ménard, J.F., Daragon, A., Tron, F., Le Loët, X.: Rheumatoid factors, anti-filaggrin antibodies and low in vitro interleukin-2 and interferon- γ production are useful immunological markers for early diagnosis of community cases of rheumatoid arthritis. A preliminary study. *Joint Bone Spine.* 2001; 68: 144-53.
145. Raza, K., Mathsson, L., Buckley, Ch. D., Filer, A., Rönnelid, J.: Anti-modified citrullinated vimentin (MCV) antibodies in patients with very early synovitis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 627-28.

146. Soós, L., Szekanecz, Z., Szabó, Z., Fekete, A., Zeher, M., Horváth, I.F., Dankó, K., Kapitány, A., Végvári, A., Sipka, S., Szegedi, G., Lakos, G.: Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2007; 34: 1658-63.
147. Damjanovska, L., Thabet, M. M., Levarth, E. W. N., Stoeken-Rijsbergen, G., van der Voort, E. I., Toes, R. E. M., Huizinga, T. W. J., van der Helm-van Mil, A. H. M.: Diagnostic value of anti-MCV antibodies in differentiating early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 730-32.
148. Renger, F., Bang, H., Feist, E., Fredenhagen, G., Natusch, A., Backhaus, M., Burmester, G.R., Egerer, K.: Immediate determination of ACPA and rheumatoid factor--a novel point of care test for detection of anti-MCV antibodies and rheumatoid factor using a lateral-flow immunoassay. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R120.
149. Luime, J.J., Colin, E.M., Hazes, J.M., Lubberts, E.: Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2010 Feb; 69: 337-44.
150. Hoet, R.M., van Venrooij, W.J.: The antiperinuclear factor and antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. In: Smolen J., Kalden J., Maini, R.N.(ed.): *Rheumatoid Arthritis*, Springer-Verlag, Berlin 1992; 299-318.
151. Nienhuis, R.L.F., Mandema, R.A.: A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis.* 1964. 23:302-05.
152. Weller, T.H., Coons, A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol. Med* 1954; 86:789-94.
153. Jaraquemada, D., Ollier, W., Awad, J., Young A, Silman, A., Roitt, I.M., Corbett, M., Hay, F., Cosh, J. A., Maini, R.N.: HLA and rheumatoid arthritis: a combined analysis of 440 British patients. *Ann Rheum Dis.* 1986; 45:627-36.
154. Wordsworth, P., Pile, K.D., Buckely, J.D., Lanchbury, J.S., Ollier, B., Lathrop, M., Bell, J.I.: HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 1992; 51: 585-91.

155. van Zeben, D., Hazes, J.M., Zwinderman, A.H., Cats, A., Schreuder, G.M., D'Amaro, J., Breedveld, F.C.: Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. Results of a followup study. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 822-30.
156. Awad, J., Ollier, W., Cutbush, S., Papasteriadis, C., Gupta, A., Carthy, D., McCloskey, D., Brown, C.J., Boki, K., Fostizopoulos, G.: Heterogeneity of HLA-DR4 in Greeks including a unique DR4-DQw2 association. *Tissue Antigens.* 1990; 35: 40-4.
157. Yelamos, J., Garcia-Lozano, J.R., Moreno, I., Aguilera, I., Gonzalez, M.F., Garcia, A., Nuñez-Roldan, A., Sanchez, B.: Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 811-14.
158. Strotzer, M., Menninger, H., Scholz, S., Albert, E.D.: HLA typing in families with multiple cases of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 298-300.
159. Kapitany, A., Zilahi, R., Szanto, S., Szücs, G., Szabó, Z., Végvári, A., Rass, P., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1051: 263-70.
160. Garavito, G., Malagón, C., Ramírez, L.A., De La Cruz, O.F., Uribe, O., Navarro, E., Iglesias, A., Martínez, P., Jaraquemada, D., Egea, E.: Polymorphism of human HLA-DRB1 leukocyte antigen alleles and its association to juvenile rheumatoid arthritis in a sample of Colombian mestizo children. *Biomedica.* 2003; 23: 254-62.
161. Olsen, N.J., Callahan, L.F., Brooks, R.H., Nance, E.P., Kaye, J.J., Stastny, P., Pincus, T.: Association of HLA-DR4 with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 1988; 84: 257-64.
162. Weyand, C.M., Goronzy, J.J.: Correlation between HLA-DR sequence polymorphism and rheumatoid factor production. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 815: 353-6.
163. Kapitány, A., Szabó, Z., Lakos, G., Aleksza, M., Végvári, A., Soós, L., Karányi, Z., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Associations between serum anti-CCP antibody,

- rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J.* 2008; 10: 32-6.
164. Matthey, D.L., Hassell, A.B., Dawes, P.T., Cheung, N.T., Poulton, K.V., Thomson, W., Hajeer, A.H., Ollier, W.E: Independent association of rheumatoid factor and the HLA-DRB1 shared epitope with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001, 44: 1529-33.
165. Kaltenhäuser, S., Pierer, M., Arnold, S., Kamprad, M., Baerwald, C., Häntzschel, H., Wagner, U.: Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with the DRB1 shared epitope and predict joint erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2007; 46: 100-04.
166. Berglin, E., Padyukov, L., Sundin, U., Hallmans, G., Stenlund, H., Van Venrooij, W.J., Klareskog, L., Dahlqvist, S.R.: A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6: R303-08.
167. Lee, H.S., Irigoyen, P., Kern, M., Lee, A., Batliwalla, F., Khalili, H., Wolfe, F., Lum, R.F., Massarotti, E., Weisman, M., Bombardier, C., Karlson, E.W., Criswell, L.A., Vlietinck, R., Gregersen, P.K.: Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1745-53.
168. Xue, Y., Zhang, J., Chen, Y.M., Guan, M., Zheng, S.G., Zou, H.J.: The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2008; 37: 183-7.
169. Cha, S., Choi, C.B., Han, T.U., Kang, C.P., Kang, C., Bae, S.C.: Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1454-63.
170. van der Helm-van Mil, A.H., Verpoort, K.N., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W., Toes, R.E., de Vries, R.R.: The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk

- factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1117-21.
171. Valesini, G., Iannuccelli, C., Marocchi, E., Pascoli, L., Scalzi, V., Di Franco, M.: Biological and clinical effects of anti-TNF α treatment, *Autoimmunity Reviews.* 2007; 7: 35-41.
172. Cuchacovich, M., Catalan, D., Wainstein, E., Gatica, H., Soto, L., Aravena, O., Pesce, B., Sabugo, F., Aguillón, J.C.: Basal anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels and a decrease in anti-CCP titres are associated with clinical response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26: 1067-73.
173. Chen, H.A., Lin, K.C., Chen, C.H., Liao, H.T., Wang, H.P., Chang, H.N., Tsai, C.Y., Chou, C.T.: The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: 35-39.
174. Syversen, S.W., Goll, G.L., van der Heijde, D., Landewé, R., Lie, B.A., Odegård, S., Uhlig, T., Gaarder, P.I., Kvien, T.K.: Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 345-51.
175. Gyetvai, A., Szekanecz, Z., Soós, L., Szabó, Z., Fekete, A., Kapitány, A., Teodorescu, M., Sipka, S., Szegedi, G., Lakos, G.: New classification of the shared epitope in rheumatoid arthritis: impact on the production of various anti-citrullinated protein antibodies. *Rheumatology.* 2010; 49:25-33.
176. Conrad, K., Schösler, W., Hiepe, F.: Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: a diagnostic reference. Science Publishers, Berlin, 2002.